

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE MODE D'ACTION DE CERTAINS POISONS RÉNAUX

PAR LE DR W. LINDEMANN

Assistant de l'Institut de Pathologie générale de l'Université de Moscou.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Quoique les lésions anatomiques provoquées par les poisons rénaux aient été assez bien étudiées, le mode d'action de ces toxines reste encore tout à fait énigmatique.

Les lésions anatomiques sont au plus haut degré uniformes: ce n'est que très difficilement que l'on parvient à établir certains groupes, et ceci en se basant non sur la présence exclusive, mais seulement sur la prépondérance de tel ou tel symptôme anatomique.

Ainsi il est possible de ranger dans un groupe naturel tous les poisons qui provoquent la glomérulo-néphrite comme lésion essentielle, ce qui est le cas par exemple pour la cantharidine, l'acide méséréique et les autres poisons provoquant des inflammations locales au lieu de l'inoculation.

Au point de vue de l'action sur les reins, c'est à ce groupe qu'appartient aussi le virus scarlatineux.

Comme appartenant à un autre groupe, on peut citer les sels métalliques et les oxydes des métaux lourds, qui provoquent avant tout une nécrose coagulante des tubes contournés. Le représentant le plus typique de ces poisons est l'acide chromique.

Le troisième groupe est caractérisé par la vacuolisation et la destruction rapide des cellules épithéliales, dont les noyaux peuvent conserver leur aspect normal pendant un temps assez

long, ce qui différencie assez nettement ce groupe du groupe précédent, qui est caractérisé par la rapide et profonde destruction des noyaux.

Dans des stades ultérieurs, aux lésions cellulaires vient s'ajouter la formation d'une grande quantité de cylindres.

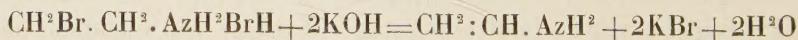
Ces lésions rénales sont engendrées par des toxines animales ou végétales comme le venin des serpents, le sérum d'anguilles, l'abrine et la ricine.

Mais entre ces différents groupes il y a de nombreuses transitions, et il est même possible de provoquer des lésions anatomiques plus ou moins intermédiaires en modifiant les doses, les espèces animales et le mode d'administration du poison. C'est pour cela que tant que le mode d'action de ces poisons nous sera inconnu, toute tentative de classification doit être considérée comme prématurée et tout fait nouveau peut présenter une certaine valeur.

C'est pourquoi j'ai accepté avec empressement la proposition de M. Metchnikoff de faire des recherches sur l'action de la vinylamine, qu'il m'a donnée, et qui lui a été envoyée par M. le professeur Ehrlich.

Cette substance présentait d'autant plus d'intérêt, qu'en se fondant sur les données de M. le professeur Ehrlich<sup>1</sup>, on pouvait s'attendre à obtenir une évolution rapide des altérations cirrhotiques, lesquelles constituent le stade consécutif de toutes les néphrites toxiques ne se terminant pas par la mort pendant la période d'intoxication aiguë.

La vinylamine  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{AzH}_2$  est l'amine primaire de l'alcool vinylique. C'est M. Gabriel<sup>2</sup> qui l'a préparée pour la première fois en faisant agir de l'hydroxyde d'amine ou de la potasse sur le bromhydrate de bibrométhylamine  $\text{CH}_2\text{Br}\cdot\text{CH}_2\text{AzH}_2\text{HBr}$ .



A l'état pur c'est un liquide de couleur jaunâtre, d'une odeur pénétrante assez caractéristique, d'une réaction fortement alcaline. Le point d'ébullition est 53-56° C. L'action

1. *Munch. Med. Woch.*, 1898.

2. *Ber. chem. Ges.*, 28.

toxique de ce corps a été constatée par M. le professeur Ehrlich, qui a signalé chez les animaux la nécrose papillaire et le développement de tissu conjonctif dans les reins.

Pour mes expériences, je me suis servi d'une préparation, qui provenait du laboratoire de M. le professeur Gabriel lui-même, et qui était conservée en glacière dans des tubes scellés.

La base libre, après dissolution dans l'eau, était titrée par une solution déci-normale d'acide chlorhydrique, le méthyl-orange servant d'indicateur. La solution originale était neutralisée par la quantité voulue d'acide, et additionnée d'eau jusqu'à la concentration de 0,5—1,0 0/0 de base libre.

C'est cette solution qui était introduite sous la peau des animaux. L'injection du chlorhydrate ne provoquait aucune réaction locale : celle de la base libre était suivie par un œdème et une inflammation assez accentuée.

Mes expériences ont été les suivantes :

1). Empoisonnement aigu de 28 souris et de 2 lapins par des doses différentes d'une solution fraîchement préparée.

2). Empoisonnement chronique de 2 chiens et 3 lapins par des injections quotidiennes d'une solution préparée d'avance. J'ai trouvé que si la solution fraîchement préparée est aussitôt mise dans des tubes scellés et est gardée au froid, à l'abri de la lumière, elle se conserve pendant un temps assez long, après avoir été rigoureusement neutralisée. Le commencement de la décomposition est indiqué par l'apparition d'un précipité lorsqu'on y ajoute de l'acide pierrique, cette réaction ne devant pas avoir lieu dans des solutions fraîches.

A l'air et à la température de laboratoire, la décomposition s'observe déjà après quelques heures.

Mais en présence de l'observation de M. le professeur Ehrlich, qui a constaté une très grande instabilité de la vinylamine, je ne me suis servi de ces solutions conservées que dans les expériences sur l'empoisonnement chronique, qui n'étaient pas possibles autrement, à cause de la très petite quantité de poison que j'avais à ma disposition.

3). Enfin pour étudier l'action de la base libre, laquelle, par analogie avec l'ammoniaque, pouvait présenter des propriétés toxiques plus énergiques que le chlorhydrate, j'ai fait encore trois expériences sur les lapins en leur injectant, dans la veine

auriculaire, de la base libre en solution aqueuse, dont la concentration était déterminée par titrage. L'action sur les reins était tout à fait identique à celle provoquée par le chlorhydrate.

En injectant, sous la peau des souris, des doses considérables (0,5-1,0 mg. à un animal de 45 gr.) on observe, une demi-heure après, un tremblement qui fait bientôt place à des convulsions cloniques se répétant sous forme d'accès pendant 2 à 3 heures, après quoi les convulsions sont suivies par une parésie progressive. L'animal est couché sur le flanc, les extrémités allongées : il respire bien faiblement. Enfin la respiration s'affaiblit d'avantage et l'animal meurt.

Dans les cas d'empoisonnement aigu, les souris meurent en 5-10 heures après l'injection : mais j'ai pu aussi observer des cas où, après l'injection des mêmes doses, les altérations respiratoires et la parésie rétrogradaient peu à peu, l'animal se rétablissait et ne succombait que quatre à cinq jours après, après avoir présenté des symptômes d'une néphrite aiguë.

Dans les cas où l'empoisonnement était déterminé par des doses moyennes ou petites, les symptômes de l'empoisonnement aigu n'avaient pas lieu du tout, ou se présentaient sous forme de tremblements et une sensibilité exagérée des réflexes.

Les symptômes néphritiques ne diffèrent guère de ceux qui sont provoqués par n'importe quel autre poison rénal, comme par exemple l'aloïne ou les sels chromiques.

Parmi les altérations fonctionnelles des reins, il faut mentionner avant tout une albuminurie très accentuée, qui s'observe même après l'empoisonnement par des doses très petites pendant le premier jour.

Le lendemain, on trouve dans le dépôt urinaire une quantité considérable de cylindres granuleux, de leucocytes et de noyaux cellulaires libres, entourés seulement de quelques débris du protoplasma. Les hématies ne se trouvent qu'en petite quantité et dans quelques cas seulement.

La quantité d'urine est augmentée : elle est très diluée et claire. Dans les derniers stades de l'empoisonnement, la quantité d'urine baisse de nouveau, et la mort est d'ordinaire précédée par une anurie complète. La réaction de l'urine ne change pas d'une manière appréciable, et reste acide chez les chiens, légèrement alcaline chez les lapins.

Il nous semble être de grand intérêt également de noter l'action très accentuée de la vinylamine sur la nutrition générale. Les animaux soumis à l'empoisonnement chronique maigrissent beaucoup plus vite que ne le font les animaux pendant l'inanition complète.

Ainsi un lapin, empoisonné par des injections quotidiennes de 0,0025 de vinylamine, a perdu en 4 jours 24,6 0/0 de son poids initial; un autre lapin a perdu dans les mêmes conditions en 6 jours 50,5 0/0; un troisième en 23 jours 44,3 0/0.

Tous ces animaux se nourrissaient bien, et à l'autopsie leur estomac et l'intestin étaient trouvés remplis de masses alimentaires d'aspect normal. Dans l'inanition, la mort survient chez les chiens après la perte de 40-45 0/0 du poids initial: chez les animaux de petite taille, les lapins, par exemple, elle est d'ordinaire beaucoup plus précoce. Un amaigrissement aussi prononcé ne se produit d'ailleurs qu'après un laps de temps plus long qu'à la suite de l'empoisonnement par la vinylamine.

Cela prouve que la vinylamine, outre son action sur le système nerveux et les reins, peut aussi provoquer certaines altérations au point de vue des échanges nutritifs, en agissant sur l'économie comme le font le phosphore, l'arsenic, la pulégone, récemment étudiée par moi. Mais entre l'action de la vinylamine et celle des poisons qui viennent d'être nommés, il y a une différence essentielle, c'est que la dégénérescence graisseuse, qui est le trait le plus caractéristique de ces empoisonnements, n'atteint jamais ce degré après l'injection de la vinylamine.

Les lésions macroscopiques, provoquées par la vinylamine, que l'on peut observer à l'autopsie, sont très peu accentuées. Après l'empoisonnement aigu, on trouve une hyperémie assez forte de tous les organes de la cavité abdominale, et des lésions parenchymateuses du foie et des reins. Si la survie est un peu plus longue, on trouve quelquefois la substance médullaire du rein semée de taches cunéiformes d'une couleur plus pâle, que l'on peut prendre à l'examen macroscopique pour une nécrose papillaire. Mais l'examen histologique montre qu'il s'agit seulement d'une anémie locale, provoquée probablement par la compression de quelques vaisseaux sanguins de la couche intermédiaire par les débris cellulaires qui s'accumulent en grande quantité en ce point.

Dans le cours de l'empoisonnement chronique, à ces lésions s'adjoint un amaigrissement, avec des résidus considérables de graisse dans l'épiploon et dans le tissu sous-cutané, et une dégénérescence graisseuse des organes parenchymateux, ce qui rend la lésion plus frappante chez les chiens.

Les lésions microscopiques varient selon la durée de l'empoisonnement. Chez les animaux qui n'ont survécu à l'empoisonnement que quelques heures, tout le rein se présente hyperémie, les glomérules sont bourrés d'hématies et sont augmentés de volume. Dans la plupart des capsules de Bowman se trouvent des cellules épithéliales et de l'albumine sous forme de masses spumeuses. Dans les tubes contournés, les noyaux des épithéliums ne présentent aucune altération, mais le protoplasma est gonflé et semble être plus diaphane que dans les cellules normales. La lumière des canalicules disparaît dans la plupart des cas. Beaucoup de canalicules présentent aussi des lésions d'un aspect tout à fait caractéristique, qui ressemblent bien à celles qui ont été décrites par M. Novak<sup>1</sup> au cours de l'intoxication par le venin des scorpions et des serpents, et par M. Petit<sup>2</sup> à la suite de l'empoisonnement par le sérum d'anguille.

Dans ces cellules, le protoplasma est très diaphane et vacuolisé. La structure normale de l'épithélium a tout à fait disparu, et la cellule semble remplie de vacuoles d'une forme irrégulière et de différentes dimensions.

Dans les cas où ce processus est plus accentué, ce qui arrive si la survie est assez longue, le noyau semble être situé au milieu d'un réseau de trabécules irrégulières qui passent sans interruption dans un réseau semblable formé par la cellule voisine. Dans beaucoup de canalicules, on ne retrouve plus de noyaux et il ne reste que des débris d'un pareil réseau. Ce processus donne l'impression que le protoplasma subit une dilution progressive, et que les masses fluidifiées sont entraînées par le courant d'urine.

Cette interprétation est basée sur le fait de la présence de débris cellulaires avec des noyaux bien conservés dans les canalicules droits de la couche intermédiaire, et dans le dépôt urinaire des animaux empoisonnés. Les cellules des anses de

1. *Ann. Inst. Past.*, 1898.

2. *C. R. Soc. Biol.*, 1898.

Henle et de la substance médullaire ne présentent aucune altération.

Si la durée de l'empoisonnement est encore plus grande, on trouve que la glomérulo-néphrite est augmentée d'intensité, et que les canalicules sont remplis d'une masse granuleuse. Les noyaux, qui ne présentaient presque aucune lésion dans les cas d'empoisonnement aigu, sont diminués de volume, présentent des contours irréguliers et se colorent avec une extrême intensité par toutes les couleurs de la chromatine (pyknose du noyau). Les masses de détritus cellulaires, mélangées à des cellules contractées avec des noyaux pyknotiques, sont chassées par le courant de l'urine, qui est encore sécrétée par les glomérules, dans la couche intermédiaire où ils forment de grands amas pouvant comprimer les vaisseaux sanguins, comme j'en ai fait déjà mention plus haut. Les cellules des tubes droits ne présentent aucune lésion aussi dans ces cas.

Enfin dans les cas où les animaux survivent à l'empoisonnement pendant 10 ou 20 jours, on observe que la glomérulo-néphrite diminue, mais dans les canalicules contournés les noyaux disparaissent dans un nombre de cellules de plus en plus grand, et c'est la formation des cylindres qui est le trait prédominant dans le tableau microscopique de ces lésions. Les cylindres présentent dans ces cas un aspect cireux. Ces masses hyalines remplissent la lumière non seulement des canalicules droits, mais encore celles des canalicules contournés, et se trouvent en plus grande quantité que dans toute autre intoxication rénale.

Le tissu interstitiel reste sans altérations ; on n'observe pas non plus d'amas leucocytaires autour des lésions rénales. Cette faible réaction des tissus mésodermiques dans le cours de l'empoisonnement par la vinylamine peut expliquer probablement le fait que, même dans des cas d'empoisonnement chronique, il ne survient pas de processus de cirrhose secondaire, qui est typique pour la plupart des poisons rénaux.

Ainsi, vu les altérations provoquées par la vinylamine, on pourrait classer celle-ci dans le groupe des poisons auxquels appartiennent les toxines bactériennes, et les venins animaux et végétaux, de composition inconnue, dont le mode d'action est le plus énigmatique de tous les poisons. En plus la présence de la

glomérulo-néphrite, si accentuée dans les premiers stades du processus, la rapproche du groupe de la cantharidine.

Il serait d'un certain intérêt de poursuivre plus profondément l'action toxique, en particulier en vue de l'action néphritique de tout le groupe des substitués ammoniacaux. Pour ne citer que des faits déjà connus, je peux signaler entre autres que les lésions néphritiques sont aussi provoquées par les diamines (cadavérine, putrescine) et par l'ammoniaque elle-même. La dégénérescence vacuolaire est aussi provoquée par le tétraéthylphosphonium. Étant donné le fait que beaucoup de ces substances se trouvent parmi les produits de la plupart des bactéries intestinales, comme, par exemple, le choléra et le bacille du colon, une pareille recherche pourrait élucider sur quelques points la pathogénie des néphrites qui compliquent quelquefois les infections intestinales aiguës. La vinylamine présente ainsi seulement un nouveau représentant d'un groupe déjà connu des poisons rénaux, et ne peut guère changer nos idées sur le mode d'action de ces poisons.

Mais à côté de ces poisons d'une constitution chimique bien connue et parfois bien simple, l'attention des pathologistes a été attirée dans ces derniers temps par un nouveau groupe de composition très compliquée, auquel appartiennent avant tout les toxines et les venins déjà mentionnés, et outre cela aussi les sérum de différents animaux.

Un grand nombre de ces poisons, qui constituent dans bien des cas des produits de l'organisme animal, se présentaient comme des poisons rénaux d'une force extrême, provoquant de l'albuminurie à des doses infinitésimales. Mais, si même pour expliquer l'action des poisons semblables à l'acide chromique, par exemple, qui tue un lapin à la dose de 0,05 gr. par destruction totale du rein, on ne peut pas admettre que toute la masse du détritus cellulaire représente une combinaison chimique du poison introduit avec les substances albuminoïdes du protoplasma cellulaire, parce que, de la faible quantité du poison introduit, la plus grande partie abandonne l'organisme bien vite après l'introduction, il est au plus haut degré invraisemblable qu'une pareille combinaison puisse se produire avec les poisons de ce groupe.

C'est pour cela que l'étude de ces poisons présente un intérêt

non seulement au point de vue casuistique, mais encore comme pouvant contribuer à l'explication du mode d'action de tous les poisons rénaux.

C'est Claude Bernard qui a trouvé que le sérum sanguin injecté dans les veines d'un animal appartenant à une autre espèce peut donner lieu à une albuminurie plus ou moins durable. Il avait injecté du sérum de chien à des lapins. Ces faits ont été confirmés par beaucoup d'autres observateurs, et récemment Weiss<sup>1</sup> a trouvé que tout sérum appartenant à une espèce étrangère provoque une albuminurie chez le lapin, et que même le sérum d'un animal appartenant à un autre sexe peut produire le même effet.

Il a trouvé que les sérum les plus toxiques sont ceux de chat et de cobaye : l'injection de ces sérum est même mortelle. Dans tous les cas, la quantité de l'albumine sécrétée est toujours inférieure à celle que contenait le sérum injecté.

Mais le sérum normal, même provenant d'une autre espèce animale, semble agir comme un poison rénal seulement dans des cas exceptionnels, et en particulier c'est aussi le cas pour le sérum du cobaye envers le lapin.

En injectant des doses assez grandes (jusqu'à 8 c. c. p. kg.) je n'ai pas observé dans la plupart des cas même de l'albuminurie, ce qui confirme bien les faits signalés par d'autres auteurs.

Alors, pour pouvoir faire des études sur ces poisons du sérum, il a fallu ou prendre des sérum d'une toxicité naturelle plus accentuée, ou chercher à augmenter la toxicité d'un sérum qui était inoffensif auparavant.

En suivant le conseil de M. Metchnikoff, j'ai essayé de m'approcher de la solution de cette question par une méthode qui a déjà donné de si beaux résultats à M. Bordet et à M. Metchnikoff<sup>2</sup> lui-même, c'est-à-dire d'essayer d'augmenter la toxicité du sérum envers les reins par l'introduction de la substance rénale dans l'organisme. En effet, après avoir reçu chaque semaine des injections d'une émulsion de reins de lapin, les cobayes ont fourni un sérum qui était d'une toxicité extrême pour ce dernier animal. Il provoquait, à des doses assez petites (1,25-2,6 c. c. p. kg.), non seulement une albuminurie

1. *Pflügers Arch.*, 65, Hd.

2. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1899.

nurie considérable, mais même la mort par l'urémie le 3<sup>me</sup> et 5<sup>me</sup> jour après l'injection intraveineuse.

Les témoins qui recevaient le sérum de cobayes normaux ne présentaient aucun symptôme morbide, et c'est seulement dans un cas (sur 3) que j'ai vu apparaître une albuminurie passagère après l'injection de 12 c. c. de sérum. Je n'ai jamais vu aucune action générale si minime qu'elle soit. L'expérience suivante peut en servir de preuve. Un lapin qui a reçu 8 c. c. de sérum normal ne présentait aucun symptôme morbide pendant 7 jours ; après cela il a reçu 8 c. c. de sérum de l'animal préparé par l'injection de la substance rénale. Cette dernière injection a provoqué une albuminurie déjà quelques heures après, et en 2 jours il s'est produit une anurie complète qui a amené la mort de l'animal 24 heures après.

Les reins des animaux tués par les injections de ce sérum présentent des lésions histologiques qui ressemblent beaucoup à celles que l'on trouve après l'empoisonnement par les poissons rénaux. Ces lésions consistent principalement dans une nécrosation et désintégration profonde de l'épithélium des canalicules contournés. La plupart des canalicules sont transformés en amas d'une masse granuleuse, dans laquelle on peut trouver quelques noyaux pyknotiques ou des débris de chromatine sous forme de granules ronds. Les noyaux qui persistent encore ne présentent jamais les phénomènes de chromatolyse et de gonflement, qui sont si caractéristiques pour la nécrose coagulante provoquée par des sels métalliques, et il semble qu'ici, comme dans l'empoisonnement par la vinylamine, les altérations du protoplasma précèdent celles du noyau. Les glomérules ne présentent aucune altération spécifique. Dans quelques-unes on trouve des amas d'albumine.

Dans les tubes droits de la couche intermédiaire et de la substance médullaire, on trouve de nombreux cylindres granuleux.

Ainsi l'injection de ce sérum, que l'on pourrait nommer, par analogie avec le sérum hémolytique, le sérum néphrolytique, provoque des altérations qui sont tout à fait analogues à celles qui sont provoquées par de vrais poisons rénaux.

Quel pourrait être le principe actif de ce sérum ? L'interprétation la plus probable est la suivante :

Par analogie avec d'autres agents de ce genre, on pourrait admettre ici la formation de certaines substances spécifiques, qui se forment dans le sang sous l'influence des processus de résorption de la substance rénale injectée, et ce sont ces substances qui altèrent le rein.

J'espère pouvoir prochainement élucider cette question intéressante, surtout étant donné l'intérêt essentiel que présentent maintenant les diastases et les autres substances spécifiques du sang pour la pathogénie des nombreux processus morbides.

En terminant mon petit travail, je saisis avec plaisir l'occasion de remercier bien sincèrement M. Metchnikoff pour m'avoir posé un problème si intéressant et pour le grand intérêt avec lequel il a suivi mon travail.

---

## EXPLICATION DE LA PLANCHE I

---

*Fig. 1.* — Rein d'une souris empoisonnée par la vinylamine. Hyperémie des glomérules, et dépôt d'albumine dans la capsule de Bowman.

*Fig. 2.* — Rein d'un lapin à un stade plus avancé : formation des cylindres.

*Fig. 3.* — Action du sérum néphrolytique : désagrégation des cellules épithéliales de la substance corticale du rein d'un lapin.

*Fig. 4.* — Action du sérum néphrolytique : pyknose des noyaux; formation des cylindres aux dépens du détritus cellulaire dans le rein d'un lapin.

---

# LA PROTÉOLYSE CHEZ L'ASPERGILLUS NIGER

PAR LE Dr G. MALFITANO

---

## PREMIER MÉMOIRE

---

Travail du laboratoire de M. Duclaux.

---

Les phénomènes protoplasmiques d'une cellule quelconque, végétale ou animale, comportent un double mouvement d'assimilation et désassimilation, de construction et de destruction, qu'on a surtout étudié sur les substances ternaires, et qu'on a pu attribuer dans quelques cas à des diastases assez bien définies. La mise en œuvre des matériaux alimentaires puisés dans le milieu ou emmagasinés à titre de réserve, d'une part, de l'autre, l'élimination des parties usées de la cellule, exigent un travail préalable de solubilisation. Il y a d'abord des modifications de l'ordre physique portant sur le degré de cohésion, et aussi des désintégrations moléculaires qui réduisent ces matières en groupements plus simples et plus appropriés au transport. Les phénomènes de cet ordre sont physiologiques au premier chef: nous avons le droit de croire qu'ils s'appliquent aux matières albuminoïdes comme aux corps ternaires, et que la mise en œuvre physiologique des composés protéiques, tant pour l'assimilation que pour la désassimilation, est produite par des diastases. On désigne sous le nom de *protéolyse* l'ensemble des processus de solubilisation et de désintégration des matières protéiques, sans rien préjuger du mécanisme intime ni de la signification des modifications produites, et nous appellerons diastase protéolytique celle que Bitter a trouvée dans les organismes qui liquéfient la gélatine.

J'ai pensé à étudier sur cette diastase quelques-uns des problèmes encore pendans au sujet des diastases des matières albuminoïdes. Je me suis adressé pour cela à *l'aspergillus niger*, que nous savons cultiver sur des milieux exempts de matières albuminoïdes, et duquel on a déjà tiré tant de résultats intéressants.

Voyons comment nous pouvons mettre en évidence, dans le milieu de culture d'abord et dans le mycélium ensuite, la présence d'une diastase dissolvant la gélatine, et comment nous pourrons juger de sa quantité.

## I

## ÉTUDE DE LA DIASTASE DANS LE MILIEU

On ne sait pas bien comment agit la diastase qui liquéfie la gélatine. Mais il n'est pas nécessaire de le savoir pour en faire l'étude. Il suffit que l'effet qu'elle produit soit facilement appréciable, et qu'on puisse juger en gros de la puissance de la diastase par le temps qu'elle met à liquéfier une certaine quantité de gélatine à laquelle elle est mélangée, ou par la quantité de gélatine qu'elle peut liquéfier pendant le même temps.

1<sup>o</sup> *Dosage du pouvoir protéolytique du milieu de culture.* — Dans un tube à essais qui contient 5 centimètres cubes de gélatine au thymol, fondue à basse température, on ajoute 10 c. c. de liquide provenant d'une culture déjà mûre d'*aspergillus*, sur milieu Raulin; on mélange bien le contenu, et on porte le tube à l'étuve à 35°. Après 12-20 heures la gélatine ne se solidifie plus quand on la refroidit jusqu'à 15°. Ce phénomène est dû à l'action d'une diastase, parce que dans un tube pareil, dans les mêmes conditions, la gélatine ne perd pas sa propriété de se reprendre en gelée, si on a chauffé pendant quelques minutes à 100° le liquide de culture avant de l'ajouter. Pour introduire des mesures dans l'observation de ce phénomène, nous opérons donc de la façon suivante :

On prépare une certaine quantité de tubes à essais, dans lesquels on verse 5 c. c. d'une solution de gélatine à 20 0/0, additionnée de thymol cristallisé dans la proportion de 2 grammes par litre. On mélange à la gélatine fondue à basse température le liquide diastasique ramené toujours au même volume et à la même réaction, car nous verrons plus tard que la réaction acidé

ou alcaline a de l'influence. Les tubes ainsi préparés sont portés à l'étuve à 35°. A des intervalles de temps déterminés, on les retire et on les refroidit dans un bain d'eau jusqu'à la température de 15°, marquée par un thermomètre plongé dans un de ces tubes. On considère l'action comme terminée lorsque la gélatine à cette température reste liquide en permanence. Le pouvoir protéolytique est d'autant plus *faible* que le nombre d'heures nécessaire pour amener le mélange à cet état est plus grand.

Il est nécessaire, dans une série d'expériences comparatives, que la gélatine provienne de la même préparation. Car deux échantillons de la même gélatine, chauffés différemment, ne se comportent pas de même vis-à-vis de la diastase, et celle qui a été chauffée le plus longtemps ou à une plus haute température perd plus vite la faculté de se solidifier par refroidissement.

Il faut aussi attendre 10-15 minutes après que la gélatine a atteint la température de 15° avant de vérifier son état, car il y a souvent un retard à la solidification. D'autre part, à cause du phénomène contraire, il ne faut pas refroidir à une température plus basse pour arriver plus vite à la solidification, si on veut revenir après à la température de 15°. Enfin il est bon, surtout dans les expériences de longue durée, d'agiter le contenu du tube avant de refroidir, pour éviter les solidifications irrégulières.

Nous nous sommes assurés que la même quantité de diastase liquéfie tous les tubes dans le même temps et que, pour des quantités différentes, le temps varie en sens inverse de la quantité de diastase employée.

La méthode proposée par Fermi (verser le liquide diastasique, dans un tube de petit calibre, sur la gélatine au thymol à l'état solide, et évaluer l'action protéolytique par le nombre de millimètres de gélatine liquéfiée) ne nous a pas donné de bons résultats. Elle s'est montrée moins précise et moins sensible, d'abord parce qu'on est forcé d'opérer à la température du laboratoire, peu favorable et surtout inconstante. De plus, rien n'assure le contact de la diastase avec la gélatine. L'action, dans ces conditions, est beaucoup plus longue, et ces diastases sont bien fragiles. Enfin il est bien plus commode et d'une plus grande sensibilité d'évaluer l'action par le temps nécessaire pour obtenir un effet déterminé, que de mesurer des millimètres.

*2<sup>o</sup> Influence de la réaction du mélange sur le pouvoir liquéfiant.* — Pour bien établir l'influence de la réaction, nous avons opéré de la façon suivante :

La réaction du liquide de culture de Raulin est variable. Dans un cas elle correspondait à 3,5 c. c. de **solution** décime de NaOH (n/10) pour 100 c. c. de liquide : avec une **solution** titrée d'acide tartrique on l'a portée au titre n/20. Une série de tubes de gélatine au thymol, tous pareils, ont reçu la même quantité de ce liquide diastasifère acide, et les quantités de soude et d'eau chloroformée indiquées dans le tableau suivant.

Liquide de culture acide n/20.	Solution de NaOH n/20.	Eau chloroformée.	Liquéfaction après.
N <sup>o</sup> 1 5 c.c.	0,0 c.c.	5,0 c.c.	62 heures.
N <sup>o</sup> 2 5	0,5	4,5	62
N <sup>o</sup> 3 5	1,0	4,0	62
N <sup>o</sup> 4 5	1,5	3,5	62
N <sup>o</sup> 5 5	2,0	3,0	74
N <sup>o</sup> 6 5	2,5	2,5	240
N <sup>o</sup> 7 5	3,0	2,0	—
N <sup>o</sup> 8 5	3,5	1,5	—
N <sup>o</sup> 9 5	4,0	1,0	—
N <sup>o</sup> 10 5	4,5	0,5	—
N <sup>o</sup> 11 5	5,0	0,0	—

Les résultats de l'expérience, exprimés en nombre d'heures à la dernière colonne, prouvent que notre diastase n'agit qu'en réaction acide. Il apparaît en outre nécessaire, pour obtenir des résultats comparables, d'opérer toujours dans les mêmes conditions de réaction.

Pendant toutes les recherches qui suivent, le liquide à essayer était porté toujours au titre n/20 en se servant de la phénolphtaléine comme indicateur.

*3<sup>o</sup> Apparition et variation de la diastase protéolytique dans le milieu, en rapport avec l'âge de la culture et les changements des substances dissoutes.* — Par les travaux antérieurs sur l'*Aspergillus* cultivé sur liquide Raulin, nous savons déjà que lorsque la moisissure a atteint son degré maximum de développement, la couleur du milieu vire du jaune clair au brun ; à ce moment la quantité de substances fixes dissoutes est minime. Dans des cultures qui se sont bien développées, j'ai trouvé un extrait sec variant entre 2,15 et 1,2 grammes par litre de liquide filtré, avec une teneur de 0,6 à 0,35 gr. en cendres. La réaction du sucre a disparu, celle des nitrates est encore apparente, mais très peu sensible. L'acidité est très faible.

Le liquide de culture est donc presque complètement épuisé par le mycélium fructifié, et qui, à partir de ce moment, mûrit et se laisse macérer dans son milieu, où il abandonne peu à peu les matériaux qui le composent avec ses diastases.

En effet, si on ajoute au liquide d'une culture déjà mûre 4 ou 5 fois son volume d'alcool, ou si on le sature avec du sulfate d'ammoniaque, on peut voir se former un trouble qui, après un certain temps, donne un dépôt floconneux. La solution de tannin rend aussi le liquide opalescent et le précipite même quelquefois. Ce précipité manque dans le liquide originel, et nous sommes là en présence de produits de la vie du microbe. Nous étudierons plus tard de près la nature de ce dépôt; il nous suffit à présent de savoir qu'il contient une substance albuminoïde qui se comporte comme une albumose.

Pour étudier, pendant les divers âges du mycélium, les phénomènes physiologiques exprimés par les changements des substances dissoutes dans le milieu, en rapport avec les variations de la diastase protéolytique, nous avons opéré de la façon suivante :

On a ensemencé 10 ballons à fond plat et à double tubulure, contenant chacun 300 c. c. de liquide Raulin stérilisé, ensemencé avec des spores d'une culture pure d'*Aspergillus*. De ces cultures laissées à l'étuve à 35°, on prélevait tous les deux jours de chacune une dizaine de c. c. de liquide, avec des pipettes flambées. On mélangeait ensemble chaque fois ces prises pour avoir un échantillon de composition moyenne. Ce liquide servait pour les dosages de l'acidité, du sucre et de l'azote. De plus, à 5 c. c. on ajoutait 20 c. c. d'alcool à 95°; les tubes qui contenaient ces mélanges étaient collectionnés, et, l'expérience finie, on pouvait apprécier à l'œil les variations dans la quantité du précipité. Pour essayer le pouvoir protéolytique sur la gélatine, on prenait chaque fois 25 c. c. de ce liquide de culture, on y ajoutait la quantité nécessaire d'acide tartrique titré et d'eau pour porter le volume à 30 c. c. et l'acidité à  $n/20$ , et on en versait des quantités de 10, 8, 6, 4, 2 c. c. dans des tubes de gélatine, qu'on ramenait tous au volume de 15 c. c.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus. L'acidité est exprimée en c.c. de la solution de soude n/10, le sucre et l'azote en grammes par litre. L'azote était mesuré par la méthode de Kjeldahl. La dernière colonne donne les durées en heures du temps au bout duquel la gélatine ne se prend plus en masse, en présence des doses de culture avec lesquelles on l'a mélangée.

Il faut d'abord remarquer que le développement de l'*aspergillus* dans les conditions indiquées a été plus lent que dans les

## PROTÉOLYSE CHEZ L'ASPERGILLUS.

65

Prises de liquide, culture.	Age de la culture.	Aspect du mycélium.	État du milieu.	Acidité 0,0.	Sucre 0/0.	Azote 0/0.	Précipité par l'alcool.	Temps nécessaires à la liquefaction			
								10	8	6	4
1 <sup>er</sup>											
2 <sup>e</sup>	48 heures	Voile très mince	24,5	4,45	0,042						
3 <sup>e</sup>	72	Voile plissé	26,4	4,44	—						
4 <sup>e</sup>	96	id.	26,4	3,21	0,028						
5 <sup>e</sup>	120	Galette épaisse	46,0	4,76	0,024						
6 <sup>e</sup>	144	Commencement de sporulation	25,2	0,86	0,021						
7 <sup>e</sup>	192	Sporulation complète	9,0	0,63	0,047						
8 <sup>e</sup>	226	Mycélium mûr	3,5	0,25	0,027						
9 <sup>e</sup>	264	id.	3,0	0,20	0,035						
10 <sup>e</sup>	286	Brun et trouble	?	—	0,040						
11 <sup>e</sup>	312	En décomposition	id.	?	0,058						
		Décomposition avancée	id.	?	—	0,077					
					id.						
								36	72	96	216
								36	36	72	144
								24	36	60	120
											360
								24	48	72	168
									48	72	168

cultures à l'air libre. Au début l'augmentation de l'acidité est due à l'aération insuffisante.

Voici les faits que nous avons à relever :

D'abord la diastase augmente dans le liquide avec l'âge de la culture ; quand le mycélium mûrit et quand il entre en décomposition, la quantité de diastase atteint son maximum. Après ce moment la diastase doit être lentement détruite. Le liquide nutritif s'appauvrit pendant le développement du microbe ; le sucre disparaît peu à peu ; l'azote ammoniacal rapidement ; l'azote nitrique, que nous avons estimé par l'intensité de la coloration avec la diphenylamine, beaucoup plus lentement. Mais l'azote dosable par la méthode de Kjeldahl, après avoir atteint un minimum, augmente de nouveau rapidement, et dépasse considérablement la quantité primitive. Ceci fait penser que l'azote sous forme d'ammoniaque et d'acide nitrique est absorbé d'abord par la plante et assimilé ; lorsque celle-ci meurt et s'épuise, l'azote passe de nouveau dans le liquide sous une forme organique, qui se laisse doser par la méthode de Kjeldahl.

Le précipité formé par l'alcool manque jusqu'au moment où la moisissure commence à mûrir ; il apparaît alors et augmente pour diminuer de nouveau à la fin : des cultures très vieilles ne donnent plus qu'un louche très faible.

4<sup>e</sup> *Variations de la quantité de diastase dans le milieu en rapport avec différentes conditions de vie du microorganisme.*—Nous avons porté notre attention sur l'influence de l'aération, de la température et du mode d'alimentation.

a) *Influence de l'aération.*—Nous avons pris 12 ballons de culture d'*Aspergillus* sur liquide Raulin parfaitement comparables, et nous les avons distribués en quatre groupes. Les ballons du groupe A sont laissés dans les conditions ordinaires. Ceux du groupe B, reliés à la trompe, sont traversés pendant toute la durée de l'expérience par un courant d'air. Les deux groupes C et D sont d'abord placés dans les mêmes conditions que le groupe B, mais on arrête ensuite le courant d'air, dont on empêche le renouvellement, dans le groupe C, avant la fructification, et dans le groupe D, la fructification étant bien avancée.

Des chiffres des analyses opérées, il résulte que le manque d'une aération suffisante ralentit le développement du mycélium et que l'activité protéolytique subit le même sort. Si la priva-

tion de l'air est plus complète et si le mycélium n'est pas encore mûr, tout s'arrête, le développement du mycélium comme les changements dans la constitution du milieu, et la diastase ne s'augmente que très lentement, la quantité finale restant très faible. Si on empêche l'arrivée de l'air seulement lorsque la plante est déjà mûre, la sécrétion de la diastase ne diffère en rien de ce qu'elle est dans une culture normale.

On peut donc conclure que la quantité de la diastase dans le milieu est strictement liée à l'intensité de développement du mycélium comme masse de cellules et degré de maturité. Elle n'est pas directement influencée par les conditions d'aération.

*b) Influence de la température.* — La température non plus ne paraît pas avoir une influence directe sur la sécrétion de la diastase protéolytique.

On a ensemencé 6 ballons en tout, comparables entre eux, et dont trois ont été portés à l'étuve à 35°, et les trois autres à celle à 25°. — L'étude du liquide a été suivie avec les mêmes règles que dans les recherches précédentes.

Les résultats fournis par cette dernière expérience ont attiré notre attention sur un fait bien intéressant. La sécrétion de la diastase dans le milieu ne paraît pas dépendre du développement actif, mais plutôt de la décomposition de la plante.

Voici pourquoi. Les cultures entretenues à 25° se sont développées et sont entrées en fructification plutôt, mais le mycélium déjà mûr s'est mieux conservé et la quantité de diastase dans le liquide a augmenté plus lentement. Dans les cultures à 35°, il y a eu un développement plus lent mais plus intense, le mycélium a mieux épuisé le liquide; bientôt après il s'est décomposé, et le liquide s'est enrichi de diastases et de substances inertes.

*c) Influence du mode d'alimentation.* — Le liquide Raulin est pour l'aspergillus le milieu nutritif de choix, et on peut, en y remplaçant méthodiquement les sels ammoniacaux par des matières albuminoïdes, chercher si celles-ci peuvent convenir à la plante, et comment elles influent sur la quantité de diastase protéolytique.

Nous avons commencé par expérimenter sur des cubes de blanc d'œuf ou des flocons de fibrine, qui n'ont pas été digérés.

On a préparé ensuite une solution de caséine purifiée dans le

carbonate de soude, qu'on a exactement neutralisée, et après l'avoir filtrée on l'a distribuée dans trois ballons : dans un premier ballon A on a ajouté 20 grammes de sucre et 2 grammes de tartrate neutre d'ammoniaque ; dans un autre, B, seulement 20 grammes de sucre, et dans un troisième C on laisse la solution de caséine seule.

Ces trois milieux après stérilisation sont ensemencés uniformément et donnent un développement très lent, qui devient toutefois considérable dans les ballons A et B après une semaine, tandis qu'il reste très maigre dans le troisième ballon C.

Voici ce qui se passe dans le milieu. Dans les deux premiers ballons, quand le mycélium commence à se développer, la caséine est précipitée, probablement par une formation d'acide. Ce coagulum forme une couche au fond du vase, et c'est seulement lorsque la plante est mûre et commence à se décomposer qu'on voit ce dépôt s'émettre et se dissoudre ensuite presque complètement. Dans le ballon C, où la plante dispose de caséine pour tout aliment, et où son développement est chétif, rien ne change dans l'aspect du milieu, qui reste homogène jusqu'à la fin.

Après trois semaines, on a prélevé du liquide de ces cultures, et après s'être assuré qu'il n'y avait pas eu d'infection par des microbes étrangers, on l'a soumis à des essais appropriés pour déterminer l'état de la caséine. On voit que, dans les deux premiers ballons, la caséine a été complètement digérée, et même profondément modifiée, puisqu'on ne trouve plus de caséine coagulable et peu d'albumoses, tandis que dans le ballon C il y a encore une partie considérable de caséine inattaquée.

Encore plus significatifs et dans le même sens sont les résultats des expériences faites dans le même ordre avec une solution à 2 0/0 de gélatine. Les trois cultures obtenues présentaient un état de développement encore plus différent : considérable dans le ballon A (contenant gélatine, sucre et le sel ammoniacal), maigre dans le ballon B (gélatine et sucre), et tout à fait insignifiant dans le ballon C (solution de gélatine seule). Les essais pour déterminer à quel point avait été poussée la digestion de la gélatine ont été effectués par la méthode d'insolubilisation de cet albuminoïde par la formaldéhyde. Ils ont montré que la digestion avait été plus intense dans le ballon A que dans l'autre B, et tout à fait faible dans le ballon C.

Nous voyons donc que la caséine et la gélatine sont bien digérées par l'*Aspergillus*, mais seulement là où le développement a été plus abondant, et où la plante avait des aliments assimilables tout prêts; c'est le mycélium formé aux dépens de ces aliments qui digère et dissout la matière albuminoïde ajoutée.

Le faible développement observé, avec la gélatine et la caséine seules, tient peut-être à ce que ces matières contiennent encore une petite quantité de produits de dégradation. Quand on opère avec de la gélatine bien lavée dans l'eau froide, le développement est encore moins abondant, et ne donne que de rares filaments mycéliens qui arrivent individuellement à fructification, et finissent par former, à force de générations successives, une pellicule mince à la surface du liquide. J'ai vainement essayé d'adapter l'*Aspergillus* sur les milieux albuminoïdes, et ce ne sera que lorsque j'y aurai réussi que je pourrai étudier l'influence de ce mode de nutrition sur la diastase protéolytique.

De toutes ces recherches, nous pouvons conclure que la sécrétion de la diastase protéolytique est un fait constant de la vie du microorganisme : toutes les conditions extérieures qui peuvent l'influencer agissent d'abord directement sur le développement du mycélium.

La quantité de diastase qu'on trouve dans le milieu paraît seulement dépendre de la masse de cellules formées et du degré de maturité qu'elles ont atteint.

L'apparition de la diastase dans le milieu ne paraît pas liée à la vie, mais bien à la mort des cellules.

## II

### ÉTUDE DE LA DIASTASE DANS LE MYCÉLIUM

Pour étudier la diastase protéolytique contenue dans les cellules, nous avons broyé le mycélium avec du sable, et nous avons fait macérer la pâte ainsi obtenue dans l'eau chloroformée.

Nous nous sommes proposé d'étudier les variations de la diastase protéolytique en rapport avec les changements subis par les substances qui constituent ce liquide de macération.

Dans ce but nous avons mis en train le même jour, dans les mêmes conditions, à l'étuve à 35°, des cultures d'*aspergillus niger* dans de grandes cloches à pommes de terre, qui contenaient chacune 900 c. c. de liquide Raulin stérilisé. Au bout de 36 heures nous avons commencé à prélever des cultures pour les étudier, et ainsi de suite de 48 heures en 48 heures.

L'examen a été conduit de la façon suivante :

On retire avec les doigts le mycélium d'une cloche, on l'exprime d'abord sur son propre liquide de culture, puis entre des feuilles de papier buvard, de manière à pouvoir opérer toujours de la même façon. La récolte est pesée chaque fois, ensuite placée en totalité ou en partie dans une capsule pour être séchée à l'étuve à 405°. Sur la matière sèche on fait les différents dosages dont les résultats sont inscrits au tableau n° 1.

Le liquide de culture est porté à un litre et employé aux déterminations quantitatives dont le tableau n° 2 donne les chiffres. L'acide est représenté par le nombre de c. c. de liqueur décime de soude nécessaire pour saturer 100 c. c.

En même temps on retire chaque fois de l'étuve des cultures du même âge et du même aspect, en tout comparables à celle dont on a fait l'analyse complète, et on y prélève 50 grammes de mycélium frais. Cette nouvelle récolte est mélangé avec 100 grammes de sable quartzeux lavé, et le tout est broyé à la molette sur une plaque en verre dépoli, avec très peu d'eau et en prenant soin d'éviter les pertes. La pâte obtenue, soigneusement ramassée, est jetée dans un vase gradué et additionnée d'eau chloroformée jusqu'à ce que le volume atteigne 500 c. c.. On remue pendant quelque temps le mélange et on le laisse ensuite en repos pendant 10-15 heures.

Le liquide supérieur est alors décanté et sert pour les dosages dont les résultats sont rapportés au tableau n° 3.

L'expérience résumée par les chiffres des trois tableaux ci-après nous apprend que la diastase protéolytique ne se révèle qu'en petite quantité au commencement, et augmente avec l'âge, d'abord dans le mycélium et plus lentement dans le milieu.

Le fait bien évident que dans le mycélium elle augmente d'abord et ensuite diminue, tandis qu'elle augmente toujours pendant l'expérience dans le milieu, prouve encore une fois que la diastase diffuse des cellules dans le liquide au fur et à mesure que la culture vieillit.

On est amené à faire une observation très intéressante quand on compare les chiffres qui expriment les variations de la diastase et de sa distribution avec ceux qui représentent les changements dans la constitution des cellules et dans la composition du milieu.

## PROTÉOLYSE CHEZ L'ASPERGILLUS.

### I. — MYCÉLIUM

Ordre de prélèvement....	I 36 heures.	II 86 heures.	III 144 heures.	IV 216 heures
Age de la culture.....		Voile mince uni.	Voile plissé en commun.	Peau épaisse en pleine sporulation.
Aspect de la culture.....				Peau épaisse mais flasq. sans cons.
Poids mycélium frais gr.	41,69	46,01	65,50	67,50
Humidité 0/0.....	38,50	74,40	79,90	85,80
Poids mycélium, sec.....	7,18	12,70	13,10	9,50
Azote 0/0.....	8,12	5,05	4,66	4,55
Cendres.....	5,80	3,50	3,70	5,18
Substance organ. totale..	6,76	12,26	12,62	9,14
Azote total.....	0,583	0,641	0,610	0,431

### II. — LIQUIDES DE CULTURE

Aspect du liquide.....	Jaune clair.	Jaune clair.	Jaune clair.	Jaune brun.
Acidité.....	16,80	16,00	0,80	?
Saccharose total, gr. ....	24,48	10,40	0,50	Traces.
Extrait sec — ....	26,38	14,30	0,85	0,62
Cendres — ....	0,714	0,320	0,300	0,276
Matière organ. — ....	23,666	10,978	0,550	0,446
Azote amm. et or. — ....	0,260	0,230	0,255	0,350
Azote nitrique — ....	0,222	0,028	0,032	0,030
Liquéfaction des tubes de gélatine pour.....	40 c. c.	Ap. 376 heur.	Ap. 422 heur.	Ap. 288 heu.
	8 —	— —	— 480 —	— 336 —
	6 —	— —	— 690 —	— 384 —
	½ —	— —		— 432 —
	2 —	— —		

### III. — LIQUIDE DE BROYAGE

Réaction et caractère du liquide de broyage.....	Très acide blanc coag. par la chal.	Très acide gris coagule par la chal.	Acide brun coagule par la chaleur.	Faibl. acide noir, se tr. par la chal.
Azote total dans 100 c. c.	0,0504	0,0612	0,0364	0,0294
— coagulable .....	0,0168	0,0322	0,0168	0,0098
Liquéfaction des tubes de gélatine pour.....	10 c. c. ap. 168 h.	Ap. 72 heur.	Ap. 48 heur.	Ap. 96 h.
	8 — 240	— 144 —	— 120 —	— 340 —
	6 — —	— 240 —	— 144 —	— 264 —
	4 — —	— 311 —	— 240 —	— 288 —
	2 — —		— 360 —	— 480 —

On voit au commencement la plante faire activement la synthèse des matériaux qui doivent la constituer. Le travail d'assimilation est dans sa plus grande intensité. Les cellules, qui toutes sont jeunes, travaillent non seulement à bâtir leurs parties constitutantes, mais encore à préparer des matériaux

de réserve. Elles sont les plus riches en substances organiques et surtout en azote. La diastase protéolytique se montre encore peu active.

Ensuite le mycélium augmente en poids et beaucoup plus en volume, il devient plus riche en eau et en cendres. La quantité de substances organiques augmente aussi, mais dans une proportion plus faible relativement aux matériaux inorganiques. Cette augmentation est plus considérable pour les composés du carbone que pour ceux de l'azote. Ainsi la teneur en azote du mycélium a baissé, alors que la quantité totale a augmenté. Le milieu est de plus en plus épuisé. La diastase augmente alors dans les cellules. L'assimilation et la désassimilation se contrebalancent dans leurs effets.

Lorsque la sporulation est complète, les cellules ont accompli leur cycle vital; le mycélium n'augmente plus, au moins en substances organiques; les composés de l'azote les plus activement formés au début commencent les premiers à diminuer. La diastase protéolytique est au maximum dans les cellules. Les processus de désassimilation prennent le dessus, deviennent de plus en plus actifs. Le milieu de culture, qui était presque complètement épuisé après avoir fourni à la plante tout ce qu'elle a employé à sa construction et tout ce qu'elle a brûlé pour son entretien, commence à s'enrichir en matériaux organiques solubles. Nous avons pu y retrouver des produits, comme les albumoses, qui n'y étaient pas avant et qui proviennent sûrement de la décomposition du plasma cellulaire. Les filaments mycéliens se vident de leur contenu dans le liquide de culture, et ils y abandonnent leurs substances inertes et leurs diastases.

Les chiffres d'analyse du liquide de broyage sont encore plus significatifs pour démontrer qu'à l'intérieur des cellules il s'est fait un travail de synthèse des substances albuminoïdes d'abord, et une protéolyse ensuite.

La marche du phénomène, telle qu'elle ressort de nos analyses, est déterminée, par un ensemble de cellules, qui doivent se trouver en majorité au même état de développement. Cette facilité expérimentale n'est réalisable qu'avec l'*Aspergillus* cultivé sur un milieu aussi excellent que le liquide Raulin.

## III

## LA PROTÉOLYSE DANS LES CELLULES

Nous avons vu que dans nos cultures l'échange organique, qui a lieu à l'intérieur des cellules, se révèle d'une manière bien saisissable à deux moments distincts. C'est d'abord le travail d'assimilation qui, étant prépondérant, fait passer dans le mycélium les matériaux dissous dans le milieu. Ensuite des processus de désassimilation surviennent, et le milieu s'enrichit de nouveau.

1<sup>o</sup> *Exchange de l'azote.*

Dans une expérience qui en résume plusieurs autres, lesquelles faites séparément avaient donné le même résultat, nous avons réalisé les conditions nécessaires pour mieux étudier ces phénomènes en ce qui concerne l'échange de l'azote.

Nous avons mis en train des cultures de notre moisissure dans des petits ballons qui contenaient chacun 50 c. c. de liquide Raulin stérilisé. Afin de simplifier l'analyse, on avait, dans ce cas, substitué à l'azotate le tartrate neutre d'ammoniaque en quantité correspondante pour la teneur en azote. De ces cultures entretenues à l'étuve à 35°, on a prélevé un certain nombre à divers intervalles de temps, pour différencier les divers âges, et on les a distribuées en trois groupes, qui sont soumis à l'examen suivant.

1<sup>er</sup> groupe. Chaque fois on sépare le mycélium de son milieu de culture, et on dose séparément l'azote dans l'un et dans l'autre par la méthode de Kjeldahl.

Ordre de prélèvement	Age de la culture	AZOTE			Total calculé
		dans le milieu	dans le mycélium	—	
1 <sup>o</sup>	24 heures	0 <sup>gr</sup> ,0318	0 <sup>gr</sup> ,0282	—	0 <sup>gr</sup> ,0330
2 <sup>o</sup>	48 —	0 <sup>gr</sup> ,0116	0 <sup>gr</sup> ,0397	—	0 <sup>gr</sup> ,0513
3 <sup>o</sup>	72 —	0 <sup>gr</sup> ,0090	0 <sup>gr</sup> ,0443	—	0 <sup>gr</sup> ,0503
4 <sup>o</sup>	120 —	0 <sup>gr</sup> ,0235	0 <sup>gr</sup> ,0295	—	0 <sup>gr</sup> ,0330
5 <sup>o</sup>	240 —	0 <sup>gr</sup> ,0311	0 <sup>gr</sup> ,0224	—	0 <sup>gr</sup> ,0335

2<sup>o</sup> groupe. Le mycélium séparé de son milieu de culture est laissé 48 heures à digérer à 35° dans 50 c. c. d'eau thymolée, ensuite on chauffe pendant un quart d'heure à 100°, on sépare le mycélium du liquide et on dose séparément l'azote.

Ordre du prélèvement	Age de la culture	AZOTE			Total calculé
		dans le milieu de culture	dans le liquide de digestion	dans le mycélium digéré	
1 <sup>o</sup>	24 heures	0 <sup>gr</sup> ,0406	0 <sup>gr</sup> ,0119	0 <sup>gr</sup> ,0043	0 <sup>gr</sup> ,0568
2 <sup>o</sup>	48 —	0 <sup>gr</sup> ,0140	0 <sup>gr</sup> ,0175	0 <sup>gr</sup> ,0099	0 <sup>gr</sup> ,0414
3 <sup>o</sup>	72 —	—	0 <sup>gr</sup> ,0187	0 <sup>gr</sup> ,0212	—
4 <sup>o</sup>	120 —	0 <sup>gr</sup> ,0239	0 <sup>gr</sup> ,0098	0 <sup>gr</sup> ,0182	0 <sup>gr</sup> ,0519
5 <sup>o</sup>	240 —	0 <sup>gr</sup> ,0338	0 <sup>gr</sup> ,0073	0 <sup>gr</sup> ,0133	0 <sup>gr</sup> ,0544

3<sup>e</sup> groupe. Le mycélium, séparé de son milieu de culture et additionné de 50 c. c. d'eau thymolée, est d'abord chauffé pendant 1/4 d'heure à 400° et laissé ensuite macérer à 35° pendant 48 heures. Enfin on dose séparément l'azote comme dans le groupe 2.

Ordre du prélevement	Age de la culture	AZOTE			Total calculé
		dans le milieu de culture	dans le liquide de macération	dans le mycélium digéré	
1 <sup>o</sup>	24 heures	0 <sup>gr</sup> ,0333	0 <sup>gr</sup> ,0037	0 <sup>gr</sup> ,0106	0 <sup>gr</sup> ,0476
2 <sup>o</sup>	48 —	0 <sup>gr</sup> ,0130	0 <sup>gr</sup> ,0065	0 <sup>gr</sup> ,0309	0 <sup>gr</sup> ,0504
3 <sup>o</sup>	72 —	0 <sup>gr</sup> ,0107	0 <sup>gr</sup> ,0072	0 <sup>gr</sup> ,0281	0 <sup>gr</sup> ,0460
4 <sup>o</sup>	120 —	0 <sup>gr</sup> ,0212	0 <sup>gr</sup> ,0068	0 <sup>gr</sup> ,0252	0 <sup>gr</sup> ,0532
5 <sup>o</sup>	240 —	0 <sup>gr</sup> ,0320	0 <sup>gr</sup> ,0043	0 <sup>gr</sup> ,0162	0 <sup>gr</sup> ,0532

Des chiffres du premier groupe d'analyses, il résulte que l'échange organique de l'azote se fait en deux moments différents et de sens opposé. Par les résultats fournis par les autres deux groupes, on voit que le passage de l'azote du mycélium dans le milieu se fait aussi quand la vie du microorganisme est arrêtée. La quantité d'azote qui se dissout est beaucoup plus faible dans les essais chauffés au préalable. Cette solubilisation paraît donc due à une action diastasique, persistante après la désorganisation du protoplasma.

Cette solubilisation n'est pas limitée aux substances protéïques, puisqu'on voit toute la masse du mycélium se décomposer sans l'intervention de microorganismes étrangers. Cependant on peut dire que le mycélium en macération dans l'eau thymolée pourrait laisser se dissoudre une partie des composés azotés qui le constituent, sans que l'intervention de diastases protéolytiques soit nécessaire, et que si cela n'a pas lieu de même dans les essais chauffés au préalable, cela tiendrait aux transformations, comme la coagulation, amenées par la chaleur.

Pour me renseigner sur ce point, j'ai fait l'expérience suivante :

Dans quatre cultures comparables, âgées de 48 heures, on sépare le mycélium de son milieu, on le lave et on le chauffe à 400° pendant un quart d'heure. Ensuite, dans deux des ballons, qui contiennent le mycélium ainsi traité, on verse 50 c. c. d'un liquide de culture concentré et riche en diastase active sur la gélatine, dans deux autres le même liquide chauffé au préalable pour le rendre inactif. Après avoir gardé quelques jours ces ballons à l'étuve à 35°, on a procédé aux mêmes opérations qu'avant pour effectuer le dosage de l'azote séparément dans le liquide et dans le mycélium.

Voici les chiffres :

Liq. diastasi- fère actif.		Liq. diastasi- fère chauffé.	
AZOTE		AZOTE	
	dans le liquide	dans le mycélium	dans le liquide
N <sup>o</sup> 1	0 <sup>gr</sup> .0868	0 <sup>gr</sup> .0098	0 <sup>gr</sup> .0772
N <sup>o</sup> 2	0 <sup>gr</sup> .0910	0 <sup>gr</sup> .0084	0 <sup>gr</sup> .0700
			0 <sup>gr</sup> .0208

Ces résultats ne laissent pas douter que dans la solubilisation des composés azotés de la cellule entre en jeu une diastase, et que celle-ci est excretée dans le milieu de culture.

Ici se présente maintenant la question suivante :

L'agent, ou peut-être l'ensemble des agents diastasiques, que nous avons révélés et suivis dans leurs variations par le phénomène de liquéfaction de la gélatine, sont-ils les mêmes que ceux qui accomplissent dans le protoplasma le travail de désassimilation ?

Nous croyons pouvoir répondre affirmativement à cette question. En effet, dans la suite de nos recherches, qui seront exposées dans un deuxième mémoire, nous avons retiré, des cellules d'*aspergillus*, une diastase des substances albuminoïdes, agissant non seulement sur la gélatine, mais sur l'albumine et la caséine. Le pouvoir protéolytique mesuré, comme nous l'avons fait, sur la gélatine, ne correspond pas exactement, peut-être, à celui que cette diastase exerce vis-à-vis des albuminoïdes de la cellule, mais les expériences *in vitro* nous autorisent à penser qu'il y a entre ces différentes actions un lien de proportionnalité.

2<sup>o</sup> *Digestion dans le liquide de broyage.* — L'étude de cette protéolyse intracellulaire devient bien plus intéressante quand on fait porter la recherche sur le liquide de broyage.

Celui-ci, préparé au moyen de mycélium jeune, est d'aspect laiteux, blanc grisâtre, il filtre difficilement et incomplètement : sa réaction est nettement acide; le chauffage le rend plus opaque et quelquefois produit des coagulums. Ce liquide donne bien manifestement les réactions du biuret, de Millon, les réactions xanthoprotéïque et celle de Adamkiewicz: mais celle de Molisch, qui met en évidence le groupe sulfuré, n'est pas du tout sensible.

Si on abandonne ce liquide à lui-même, il se sépare en deux portions, un dépôt formé de petits grumeaux sous un liquide clair, jaune miel. C'est le dépôt qui contient le plus de substances

albuminoïdes, mais le liquide en contient aussi. Cette séparation est beaucoup facilitée si l'on ajoute quelques gouttes d'acide acétique, elle est, au contraire, empêchée si l'on ajoute de l'alcali. Un excès de l'un ou de l'autre de ces réactifs amène une dissolution presque complète des particules en suspension.

La substance albuminoïde principale est donc de la nature des nucléines.

Sur le liquide acidifié et décanté ensuite, nous avons opéré la séparation des divers produits solubles au moyen du sulfate d'ammonium. La réaction de la peptone a été toujours négative, mais la présence d'albumoses bien manifeste. La tyrosine et la leucine peuvent être mises en évidence quand on évapore ce liquide à basse température.

Il y a donc à l'intérieur des cellules, comme on pouvait s'y attendre, de la matière albuminoïde avec les produits de sa dégradation jusqu'aux amides; il y a encore des diastases protéolytiques. Il est vraisemblable d'admettre que le protoplasme est le siège d'une protéolyse. Nous allons montrer que celle-ci se fait aussi bien quand les albuminoïdes sont extraits de la cellule.

Geret et Hahn ont déjà établi ce fait pour le suc de levure. Avec le liquide de broyage de l'*aspergillus niger*, nous n'avons pas réussi tout d'abord à mettre en évidence cette digestion *in vitro*.

La raison de cet insuccès est que notre liquide présente une réaction trop acide qui précipite les albuminoïdes coagulables. Ceux-ci forment un dépôt floconneux, restant au fond du vase, sans se dissoudre sensiblement même après un temps prolongé. C'est seulement quand nous nous sommes avisé de modifier la réaction du mélange que nous avons pu constater une digestion. Voici comment nous avons opéré.

On a distribué du liquide de broyage, après l'avoir saturé de chloroforme, dans des petits ballons à raison de 50 c. c. chacun, et on a ajouté des quantités croissantes d'une solution de soude titrée; ensuite on a ramené, en ajoutant de l'eau dans chaque ballon, les divers liquides au même volume. On a préparé deux séries de ballons, la première a été portée à l'étuve à 35°, et l'autre aussi après avoir été chauffée à 100°.

Au bout de six jours les ballons sont retirés de l'étuve, et leur contenu, additionné de quelques gouttes d'acide, est évaporé jusqu'à dessiccation complète dans un bain marie où dans une étuve réglée à 105°. Ensuite on verse dans le ballon de l'alcool absolu et on le chauffe à l'ébullition, en ayant eu

le soin de le relier à un réfrigérant à reflux. Ainsi la graisse et les autres substances extractives sont dissoutes et en même temps les albuminoïdes coagulables sont insolubilisés par déshydratation. On répète l'opération plusieurs fois, et précisément jusqu'à ce que l'alcool reste incolore. On fait passer l'alcool employé à travers un petit filtre Berzélius, qu'on garde. On épouse avec de l'eau bouillante le résidu de l'extraction alcoolique, et on filtre à travers le même papier. La partie insoluble qui reste au fond du vase et en partie sur le filtre, ne doit contenir d'autres composés de l'azote que les albuminoïde coagulables. On réunit enfin dans le petit ballon tout le résidu en y introduisant le filtre dont on s'était servi, et on passe au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.

Cette méthode de dosage des albuminoïdes coagulables, que nous avons introduite après l'avoir soigneusement vérifiée, est la mieux appropriée pour des semblables recherches. Elle nous a rendu de grands services.

Dans le tableau suivant se trouvent les chiffres de cette expérience.

Le liquide de broyage est acide, 50 c. c. exigent 7, 2 c. c. de solution décime de soude pour virer au rouge avec la phénolphthaleïne.

Chaque ballon a reçu 50 c. c. de liquide, plus

Solution décime	Eau	Azote insoluble après digestion dans les essais	
		non chauffés	chauffés
1°	0,0 c.c.	10,0 c.c.	0 <sup>gr</sup> ,0189
2°	2,0	8,0	0 <sup>gr</sup> ,0189
3°	4,0	6,0	0 <sup>gr</sup> ,0196
4°	6,0	4,0	0 <sup>gr</sup> ,0154
5°	8,0	2,0	0 <sup>gr</sup> ,0173

Les albuminoïdes extraits de la cellule subissent encore, dans des conditions où la vie protoplasmique n'est guère possible, un processus de dégradation, qui est dû par conséquent aux agents diastasiques qui l'accompagnent. Cette protéolyse est sensiblement influencée par la réaction. Elle est générée par l'alcalinité, et devient très faible quand les albuminoïdes se trouvent à l'état de précipité.

Il y donc, là encore, une raison qui plaide en faveur de notre manière de voir. Le lien de parenté entre les agents dont nous avons suivi l'étude *in vitro*, et ceux qui opèrent au sein du protoplasma, devient plus évident du moment qu'on voit qu'ils se comportent de même vis-à-vis de la réaction du liquide.

Dans des expériences exposées plus loin, nous allons montrer que le maximum d'activité de notre diastase protéolytique se place au voisinage de la neutralité. Cela est vrai surtout pour ce qui concerne la digestion de la caséine, dont la nature chimique se rapproche le plus de celle des albuminoïdes de la cellule.

3<sup>o</sup> *Influence de la réaction sur la protéolyse intracellulaire et*

sur le développement de la plante. Notre attention a été attirée sur l'influence que la réaction du milieu peut avoir dans le phénomène d'autophagie du mycélium. A plusieurs reprises nous avions observé que tant que le milieu restait bien acide, il gardait sa couleur jaune claire, et le mycélium n'entrait pas en décomposition.

Nous avons songé alors à étudier la solubilisation de l'azote dans les mêmes conditions qu'avant, en faisant varier seulement la réaction du liquide où le mycélium était plongé. Cette expérience est résumée dans le tableau suivant.

Réaction et titre du liquide de digestion employé.	1 <sup>er</sup> GROUPE Mycélium non chauffé			2 <sup>e</sup> GROUPE Mycélium chauffé		
	AZOTE			AZOTE		
	dans le liquide	dans le mycélium	Total	dans le liquide	dans le mycélium	Total
N° 1 Acide oxalique n	0gr,0378	0gr,0311	0gr,0889	0gr,0296	0gr,0360	0gr,0856
N° 2 — n/2	0gr,0371	0gr,0455	0gr,0826	0gr,0224	0gr,0623	0gr,0847
N° 3 — n 10	0gr,0392	0gr,0434	0gr,0826	0gr,0203	0gr,0623	0gr,0826
N° 4 — n/100	0gr,0462	0gr,0315	0gr,0777	0gr,0182	—	—
N° 5 — —	0gr,0304	0gr,0336	0gr,0840	0gr,0147	0gr,0723	0gr,0870
N° 6 — n 100	0gr,0420	0gr,0448	0gr,0868	0gr,0238	0gr,0748	0gr,1022
N° 7 — n/10	0gr,0371	0gr,0304	0gr,0873	0gr,0445	0gr,0378	0gr,0323

Ces résultats montrent que c'est au voisinage de la neutralité que l'action protéolytique intra-cellulaire est la plus active.

Dans ce cas, les cellules étant mortes, la réaction du liquide devait bien affecter celle du protoplasma; cela ne devrait pas arriver pour les cellules vivantes; cependant l'influence de la réaction du milieu sur le développement de notre moisissure est encore manifeste.

Nous nous sommes demandé si la réaction du milieu de culture, en agissant sur les phénomènes de protéolyse, ne pourrait avoir une influence sur la durée du cycle vital de la plante. Tanret (18) a déjà établi dans ce sens l'influence d'un milieu très riche en azotate d'ammoniaque, et, d'après la description de ses expériences, il paraît probable que le retard dans la fructification signalé par cet auteur soit dû à la présence d'acide nitrique libre dans le milieu.

Nous avons transporté des galettes de mycélium jeune, encore parfaitement blanche, sur du liquide Raulin neuf, qui dans une série d'essais était neutralisé, et dans une autre était laissé à la réaction acide. Nous avons toujours vu le mycélium en contact avec

du liquide acide entrer en fructification avec un retard de 20 ou 30 heures sur celui qui avait été transporté sur le liquide neutralisé. Cependant ensuite il y avait formation de spores, même si on s'arrangeait de façon à entretenir le mycélium sur du liquide Raulin renouvelé continuellement pour le maintenir acide. Naturellement la réaction du milieu ne peut commander qu'indirectement ou d'une façon restreinte la réaction à l'intérieur de la cellule, surtout dans le cas de cellules qui nagent à la surface. Toujours est-il que le mycélium garde mieux sa consistance après la maturation s'il est mouillé dans un liquide de réaction acide.

\* \* \*

Après les expériences que nous venons de décrire, nous nous croyons autorisé à conclure que *dans les cellules de l'aspergillus il se fait un travail de désassimilation des composés de l'azote qui consiste dans une protéolyse dont l'agent diastasique peut bien être mis en évidence dans les cellules et dans leur milieu de culture.*

Or cette fonction de désassimilation, dont l'agent est présent à tous les moments de la vie au sein du protoplasma, doit être nécessairement entravée dans son œuvre lorsque la plante s'accroît. Nous avons vu que le pouvoir protéolytique, tel qu'il nous est révélé par la liquéfaction de la gélatine, est moins prononcé dans le suc de cellules très jeunes ; nous avons encore appris à connaître l'influence défavorable de la réaction acide sur la protéolyse intra-cellulaire. Mais tout cela n'explique pas encore le mécanisme d'un phénomène aussi complexe. Nos moyens d'investigation ne suffiront pas jusqu'au moment où il sera possible d'étudier les actions antagonistes à la protéolyse, les actions de protéosynthèse.

\* \* \*

Il se dégage de cette étude des conclusions d'ordre général.

Les résultats auxquels nous sommes arrivé ne sont pas tout à fait nouveaux dans la science. Des observations nombreuses déjà faites, par exemple sur ce qu'on appelle l'autophagie de la levure depuis l'expérience fameuse de Thénard, les expériences de Schutzenberger et les analyses de Geret et Hahn, et enfin tout récemment les travaux de Gamaleïa sur la bactériolyse, tendent à confirmer la justesse du point de vue auquel nous nous sommes placé dans l'exposé de ces recherches.

Que l'action de la diastase protéolytique doive se faire sentir aussi sur les substances albuminoïdes de la cellule qui l'a produite, tout le monde le reconnaît. Mais nous voulons attirer l'attention sur la nécessité de considérer les diastases protéolytiques des microorganismes non seulement comme des agents de la digestion intra ou extra-cellulaire, mais surtout et d'abord comme des agents de désassimilation.

Raulin a déjà fait voir que la meilleure source d'azote pour *l'aspergillus* est faite de sels ammoniacaux qui n'exigent aucun travail de digestion. Nous avons vu aussi qu'il n'y a pas de rapport entre la sécrétion de diastase protéolytique et la fonction de nutrition. On a pu au contraire saisir la corrélation qui existe entre les changements dans la constitution des cellules et du milieu et la présence de cette diastase. On sait aussi suffisamment maintenant que la vie de la cellule est, à tout moment, la résultante de deux actions antagonistes, l'une d'intégration et l'autre de désintégration. C'est, dans notre pensée, la diastase protéolytique qui, chez *l'aspergillus*, est chargée d'une partie de ce travail, celui qui consiste à démolir les constituants albuminoïdes de la cellule: cette fonction de la faculté protéolytique est la plus essentielle et la première dans l'évolution. La fonction digestive n'est qu'une adaptation ultérieure.

A vrai dire, ces deux phénomènes de digestion et de désassimilation sont si mal définis qu'on peut dire qu'ils se confondent. La matière nutritive prise par la cellule à son liquide nutritif est-elle détruite avant d'avoir fait partie intégrante du protoplasma, qui n'utilisera qu'un certain nombre de ses produits de décomposition, auquel cas elle est dite digérée? Ou bien doit-elle entrer dans la constitution du protoplasma avant d'être détruite, auquel cas elle est dite désassimilée? Bien fin qui pourrait nous le dire aujourd'hui. Pour le moment nous distinguons un travail qui précède l'assimilation et que nous appelons digestion, et un travail qui suit l'assimilation, et que nous appelons désassimilation. Ce que je veux dire, c'est que ce sont les mêmes diastases qui entrent en jeu dans les deux cas, ce qui est évidemment un argument pour les confondre.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. DUCLAUX. — *Comptes rendus de l'Ac. d. Sc.*, 1880, XCI, et *Annales de l'Inst. agronom.*, 1879-80.

2. BITTER. — *Arch. f. Hygiene*, 1886, B. V.

3. RITZ. — *Jour. Pharm. Chemie*, XVI, 8, s. 43.

4. STERLING. — *Cent. f. Bact. u. Paras.*, II Abth., Bd. I.

5. AUERBACH. — *Arch. f. Hygiene*, 1897, XXXI, 311.

6. FERMI. — *Arch. f. Hygiene*, B. XI, Heft. I; XIV, s. 1, et *Centr. f. Bact. u. Paras.*, XX, s. 387.

FERMI et BUSCALIONI. — *Annuario d. R. Ist. Botanico*. Roma, vol. VIII, 1898.

7. LINDNER. — *Mikroskop. Betriebskontrolle in den Gahrungsgewerben*, 1893.

8. WILL. — *Ann. de la Brasserie et la Distillerie*, I, p. 302.

9. BEJERINKH. — *Centr. f. Bact.*, II, Abth. III, s. 524.

10. ARTARI. — *Wochensch. f. Brauerei*, 1897, p. 602.

11. BOULANGER. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, p. 720.

12. HAHN. — *B. d. deuts. Chem. Gesell.*, 1898, XXXI, s. 200.

GERET et HAHN. — *B. d. deuts. Chem. Gesell.*, 1898, XXX, s. 202 und 233.

14. SALKOWSKI. — *Zeitsch. f. Biologie*, XXV. N. F. VII.

15. RAULIN. — *Études chimiques sur la végétation*. Thèse de la Fac. d. sciences. Paris, 1870.

16. FERNBACH. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, s. 4.

17. WEHMER. — *Centr. f. Bact.*, II, Abt. B. II, s. 92.

18. TANRET. — *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 6<sup>e</sup> série, V, 1897, p. 5.

19. SCHUTZENBERGER. — *Comptes rendus*, LXXVIII, p. 493.

20. GAMALEJA. — *Centralblatt f. Bact. und Paras.*, I, Abt. 1899.

CONTRIBUTIONS A L'ETUDE DES FERMENTATIONS VISQUEUSES

---

# RECHERCHES SUR LES BIÈRES A DOUBLE FACE

PAR H. VAN LAER

Professeur de chimie générale à l'École des mines du Hainaut,  
Directeur des études de l'Institut de brasserie de Gand.

---

§ I. *Introduction.* — Il arrive parfois que des bières claires et même absolument brillantes, lorsqu'on les regarde par transparence, paraissent troubles quand on les examine par réflexion. Le liquide, placé devant les yeux dans une bouteille en verre incolore, se montre absolument exempt de corps en suspension, mais sa teinte, au lieu d'être franchement jaune ou brune, est ternie comme si on l'avait additionné d'un fluide laiteux. Le flacon, examiné du haut, paraît contenir une liqueur opaque, couleur blanc sale, avec une fluorescence jaune caractéristique. Cette maladie est très fréquente chez les faros et les lambics, mais on la rencontre parfois avec une intensité moindre dans les bières ensemencées avec de la levure. Les praticiens bruxellois désignent cette altération de leurs produits sous le nom de « double face » ou « tweeskinde », expression qui rappelle l'aspect si différent que présentent ces bières suivant qu'on les examine par transparence ou par réflexion.

La double face se rencontre aussi bien dans les faros que dans les lambics, mais elle a été moins souvent observée dans la mars, c'est-à-dire dans la petite bière du lambic. Par contre, les lambics la présentent bien plus fréquemment et à un degré très prononcé.

Quelquefois des brassins entiers sont frappés, mais dans la majorité des cas la maladie n'affecte par-ci par-là, et avec des intensités différentes, que quelques tonnes d'un même brassin.

Dans les brasseries à fermentation spontanée, que j'examinerai surtout dans ce travail, parce que c'est chez elles que la double face apparaît le plus souvent et sous sa forme la plus caractéristique, le mal se découvre généralement après le dépôt

des lies, c'est-à-dire un an et demi à deux ans après la fabrication.

Les brasseurs bruxellois ne se trompent guère dans le diagnostic de cette maladie. Il n'en est pas de même des autres, qui confondent souvent avec elle des troubles plus ou moins accentués, tels que celui qui est produit par le bacille de la tourne (*Saccharobacillus pastorianus*), ceux que l'on connaît sous le nom de troubles d'érythrodextrine et de glutine.

La vérité est qu'il arrive parfois que des moûts acidifiés spontanément avant la mise en levain donnent des bières à double reflet ; mais cet accident de fabrication, très rare, diffère complètement quant à ses causes et à ses effets de la « double face » proprement dite, telle que nous allons l'étudier et telle que nous la présentent trop souvent les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée.

Quand on consulte les praticiens sur les causes de cette altération, on ne rencontre, en règle générale, aucune conviction bien ferme. Peu de brasseurs savent formuler à ce sujet une règle dont la rigueur n'ait été ébranlée par des exceptions plus ou moins nombreuses. Il résulte cependant d'une enquête contradictoire, que j'ai faite à ce sujet, que beaucoup de fabricants de lambic ont sinon frôlé la vérité, du moins fait quelques observations que la suite de cette étude confirmera. Ainsi, si les tonneaux dans lesquels on loge les moûts après leur refroidissement ne sont pas sains, s'ils sont moisis, il arrive fréquemment que les lambics ou les faros qui en proviennent soient à double face. Dans la plupart des brasseries à faro il est d'usage, une fois la fabrication terminée, de remiser les tonneaux après les avoir lavés et soufrés. Il importe beaucoup que le local qui sert de remise à la futaille soit bien sec, bien aéré, de façon à éviter tout envalissement des douves par les moisissures. On ne peut qu'applaudir à la pratique suivie par beaucoup de brasseurs, et qui consiste à laver la futaille, dès qu'elle vient des remises, à l'eau chaude et à la brosse, bref à la traiter comme de la futaille fraîche.

J'ajouterais que les causes d'infection de tout un brassin doivent résider, ainsi qu'on pourra bientôt en juger, dans la matière gluante gélatiniforme formée par la zooglée de certains ferment visqueux, qui se forme très facilement à l'endroit des soudures

dans les tuyaux d'entonnement fixes et indémontables.

Il n'est pas sans intérêt de dire que certains praticiens ont tenté d'établir une corrélation entre la maladie qui nous occupe et une ébullition trop courte ou défectueuse ; d'autres ont essayé d'attribuer à l'emploi de malt fortement touraillé les ennuis de fabrication sur lesquels nous allons insister.

Ce travail a été commencé en janvier 1896 : j'ai dû souvent l'abandonner à cause des nombreuses difficultés que j'ai rencontrées sur mon chemin, et dont les principales résidaient dans l'étude des organismes si variés que l'on trouve dans les bières bruxelloises. Nous allons voir que c'est à un microbe que nous devons attribuer le phénomène de la double face.

§ II. *La double face est en relation étroite avec la fermentation visqueuse.* — Dans le travail que j'ai publié en 1891 sur les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée<sup>4</sup>, j'ai dit que très souvent les faros et les lambics passent par une période de filage, après laquelle ils redeviennent fluides. J'ajoutais, à ce moment, que plusieurs brasseurs bruxellois émettent l'avis que les meilleurs produits sont ceux qui ont passé par cette phase de viscosité.

Je ne discuterai pas cette manière de voir assez originale, très répandue parmi les praticiens de Bruxelles ; mais quelque paradoxe qu'elle puisse paraître, elle est exacte dans un grand nombre de cas, bien entendu si on professe pour les bières bruxelloises à fermentation spontanée le respect que lui témoignent ses fabricants.

Avant d'aller plus loin, il importe d'établir que *tout moût de faro et de lambic, au moment où il est introduit dans les tonneaux de fermentation, contient des germes du filage, et qu'il n'y a pas un seul tonneau de faro ou de lambic qui ne deviendrait visqueux si on le plaçait dans certaines conditions.*

Pendant la campagne de 1896-97, on a prélevé, immédiatement après l'entonnement, une bouteille de moût de faro et de lambic d'une série de tonneaux différents. Cette opération s'est continuée pendant plusieurs semaines, de sorte qu'à un moment donné je me trouvais devant un stock d'environ 150 bouteilles.

On sait que dans la fabrication courante des bières bruxel-

4. Nouvelles recherches sur les bières bruxelloises à fermentation dite spontanée. (*Mémoires couronnés et autres mémoires publiés par l'Académie royale de Belgique*, t. XLV.)

loises à fermentation spontanée, immédiatement après l'entonnement, les fûts sont bouchés : on ne les laisse communiquer avec l'air que par une toute petite ouverture, par laquelle sortent l'anhydride carbonique et l'écume noirâtre qu'on voit apparaître sur les tonneaux pendant les premières phases de la fermentation, et qui finit par boucher naturellement l'ouverture de dégagement. Les tonneaux sont abandonnés à eux-mêmes dans d'immenses magasins aussi frais que possible. La fabrication des faros et des lambics est une fabrication d'hiver : commencée au commencement d'octobre, elle se termine vers le mois de mai, dès que la température devient trop élevée. Les praticiens ont observé qu'il est impossible de brasser ces bières en été.

Ces circonstances m'ont engagé à laisser fermenter le contenu de mes bouteilles dans des conditions tout à fait opposées à celles suivies dans les brasseries bruxelloises.

Cent bouteilles ont été placées dans une chambre continuellement chauffée à 18-20° C.

La fermentation terminée, les flacons sont restés ouverts jusqu'à repos complet et apparition à la surface du liquide d'un voile de mycoderme. C'est seulement alors qu'on les a bouchés et abandonnés à la température du laboratoire. Le 45 novembre 1897, les échantillons ont été examinés. *Tous, sans exception, étaient excessivement visqueux et possédaient une double face très accentuée.* Un an après, le filage avait disparu, mais la double face persistait dans quelques bouteilles.

A la brasserie, la plupart des tonneaux dont les échantillons avaient été soutirés étaient restés sains. Le contenu de cinquante bouteilles a fermenté dans une cave très froide ; elles ont été bouchées dès que la fermentation ne fut plus sensible. Quatre seulement sont devenues filantes et à double face. On se rendra compte au § V de la cause de cette exception. Les bières saines le sont restées dans la suite.

On se trouve donc ici devant un cas spécial de la fermentation visqueuse. En règle générale, quand une bière devient filante, elle reste claire ; la matière visqueuse disparaît par la suite, et la bière ne se présente que *rarement* avec la double face. Les bières bruxelloises à fermentation spontanée se comportent généralement de la même façon, mais il peut arriver que la bière redevienne fluide en conservant indéfiniment une double teinte.

Nous comprendrons bientôt les raisons de ces différences.

§ III. *Culture et identité du microbe de la double face.* — Ce n'était pas une besogne facile que celle qui consistait à isoler le microbe de la double face. Quand on fait une culture sur plaque avec le dépôt de lambics, on n'obtient souvent aucun développement, soit que les organismes aient vécu, soit qu'ils se trouvent dans un état de faiblesse telle que leur végétation sur le moût gélatinisé est impossible. Il arrive aussi que les plaques ne donnent que des colonies de levures, de torulacées et de microbes vulgaires. Pour réussir à isoler le parasite principal, il est absolument nécessaire d'opérer sur des cellules microbien-nes jeunes et vigoureuses, débarrassées autant que possible des organismes vulgaires.

Voici la méthode que j'ai suivie : des échantillons de lambics à double face d'origine et d'âge différents sont abandonnés au repos pendant plusieurs semaines dans des bouteilles hermétiquement closes, afin de prévenir l'envahissement par les mycoidermes. Quand les bières sont bien dépouillées, on prélève dans chaque flacon, dans les régions supérieures, avec une pipette flambée, un centimètre cube environ de liquide qu'on introduit aussitôt dans un ballon rempli de moût stérilisé et bien clair, en même temps qu'une trace d'une levure à faible atténuation, la levure de Saaz par exemple, et cela dans le but de réserver aux microbes une large part de l'extrait contenu dans la liqueur. On laisse la fermentation se produire et s'achever à la température ordinaire. On décante ensuite les bières dans des bouteilles stérilisées qu'on remplit presque complètement et qu'on bouche avec soin. Ces bières sont abandonnées à elles-mêmes à la température du laboratoire. Petit à petit, certaines d'entre elles se clarifient, d'autres deviennent visqueuses et à double face, et produisent un dépôt abondant d'une matière blanche zooglycéiforme. On délaie la matière zooglycéiforme dans du moût de bière stérile, afin de rajeunir les cellules par une culture de deux ou trois jours dans ce milieu. On procède enfin à de nouvelles cultures sur plaques sur moût gélatinisé, et les colonies microbien-nes obtenues sont introduites dans des ballons de culture contenant du moût stérilisé.

Au bout de trois jours d'exposition à la température ordinaire, le contenu de plusieurs flacons s'est troublé, et l'on voit à

la surface une zone glaireuse blanche très épaisse, comme si le liquide était recouvert d'une couche d'huile. Cette matière s'attache aux parois du verre lorsqu'on agite les ballons. En même temps la liqueur a pris une consistance oléagineuse.

Ces liquides contiennent souvent des mélanges d'espèces, ainsi qu'on peut s'en assurer par un simple examen microscopique ; il est donc nécessaire d'en refaire une culture sur plaque avec une quantité infinitésimale de matière et de n'employer, pour le repiquage définitif, que des plaques dont toutes les colonies sont très espacées et bien homogènes.

Examinée au microscope, une goutte d'un liquide infecté par le microbe de la double face se montre peuplée par une foule de bâtonnets de  $4\text{ }\mu$ ,  $7$  à  $2\text{ }\mu$ ,  $8$  de longueur sur  $0\text{ }\mu$ ,  $5$  à  $0\text{ }\mu$ ,  $8$  de largeur. Dans les milieux qui ne deviennent pas visqueux sous l'influence de cet organisme ou dont la viscosité a disparu, on voit les bacilles entourés d'une capsule elliptique ou allongée, au milieu de laquelle la bactéries se dessine comme une ligne plus sombre. Cette capsule est souvent étranglée en son milieu par suite d'un commencement de division. Le microbe a alors assez bien l'aspect de diplococcus et même de tétrades ou de sarcines.

Dans les cultures filantes, les capsules sont réunies par une matière zoogléiforme intermédiaire en une masse glaireuse s'écoulant comme du blanc d'œuf. Cette substance intermédiaire disparaît lorsque la période de viscosité est terminée ; les microbes n'ont plus alors que leur capsule. Avec des préparations colorées et sous un grossissement de  $950$  diamètres, on aperçoit ceux-ci comme des bâtonnets trapus à extrémités bien nettes, non arrondies. Quand on examine ainsi un échantillon prélevé dans la zone glaireuse d'un moût filant, on voit la substance zoogléiforme disposée en un réticulum à mailles très serrées, peu coloré, dans lesquelles et au travers desquelles se trouvent les bâtonnets.

Si la propriété de rendre à la fois la bière filante et à double face était l'apanage exclusif de ce microbe, si elle ne dépendait pas plutôt de certaines conditions qui font que le liquide peut être visqueux sans présenter la fluorescence caractéristique des lambics à double teinte, le nom de *B. viscosus fluorescens* serait le nom qui conviendrait le mieux à ce ferment. Mais comme cette altération caractéristique de la limpidité peut être produite

par d'autres organismes de la fermentation visqueuse, notamment par les *B. viscosus* que j'ai étudiés jadis, comme je l'ai rencontrée dans les brasseries anglaises où existait à l'état endémique un filage produit par les coccus appartenant aux espèces décrites par Brown et Morris<sup>1</sup>, puis par Héron<sup>2</sup>, je préfère désigner le parasite qui fait l'objet de cette étude sous le nom de *B. viscosus bruxellensis*, qui rappelle à la fois sa propriété physiologique principale et son origine, et ne préjuge en rien de la faculté qu'il possède de laisser parfois la double face comme trace de son passage dans la bière.

§ IV. *Caractères physiologiques tirés d'un certain nombre de milieux de culture. -- Influence de la composition du moût sur l'intensité du filage.* — Le *Bacillus viscosus bruxellensis* se rapproche beaucoup des *bacillus viscosus* que j'ai décrits en 1889; mais, dans des conditions identiques de culture, il s'en distingue par plusieurs points importants.

Sur plaques au moût gélatinisé, il donne lieu à de grandes colonies rondes, visqueuses, translucides, présentant plusieurs zones où les individus se trouvent sous des épaisseurs différentes. Le bord de la colonie est blanc et très régulier, le centre est jaune.

En cultures géantes sur le même milieu, il se forme, au bout d'une dizaine de jours d'exposition à la température ordinaire, une grande tache blanche dont le contour est limité par un rebord en saillie. Tout le long de ce rebord, et empiétant sur la partie plate de la colonie, apparaissent six ou sept grosses bulles visqueuses qui finissent par crever au bout de quelques jours. Quand on promène un fil de platine sur cette colonie, on peut voir, au moment où on l'écarte de celle-ci, son extrémité reliée à la culture par des filaments visqueux.

Le *B. viscosus bruxellensis* se développe aussi en surface et en profondeur sur l'infusion de viande gélatinisée. Les colonies, qui sont d'ailleurs sans caractère marqué, sont blanches, visqueuses, ne liquéfient pas la gélatine. Elles ont une tendance marquée à se développer en surface. Dans les cultures sur des tranches de pommes de terre cuites, il se forme des colonies grisâtres, visqueuses.

1. BROWN ET MORRIS, On a case of bacterial infection by air-sown organism. *Journ. of the fed. Institutes of brewing*, mars 1895.

2. HÉRON, *Diary for the Brewing room* pour 1899 de MM. Boake, Roberts et C°.

Le *B. viscosus bruxellensis* se développe dans l'eau de levure additionnée ou non de l'un des sucres suivants : dextrose, maltose, saccharose, lactose : le plus souvent le liquide ne devient pas filant. Cela dépend de la nature de l'eau de levure employée. Sous son influence, le lait se caille sans accuser de viscosité. Les saccharoses peptonisées dont j'ai parlé jadis dans ma note sur les fermentations visqueuses deviennent aussi gluantes.

La liqueur Mayer, que les *B. viscosus* 1 et 2 affectionnent beaucoup, augmente à peine en viscosité sous l'influence du *B. viscosus bruxellensis*.

Quand on ensemine du moût de bière avec quelques cellules prélevées dans l'une ou l'autre des cultures précédentes, ou bien dans un milieu liquide dans lequel le microbe se développe sans le rendre filant, il devient rapidement visqueux. La liqueur se présente alors avec des caractères analogues à ceux que j'ai décrits pour le *B. viscosus* n° 1 : le liquide se trouble, devient oléagineux ; sa surface se recouvre d'une couche glaireuse blanchâtre, envoyant des ramifications vers la profondeur. Le degré viscométrique, c'est-à-dire le nombre de secondes qu'il faut à 50 c. c. de liquide pour s'écouler à 18°C, à travers une ouverture de 3 millimètres de diamètre, va en augmentant de 17, par exemple, degré viscométrique du moût, jusqu'à 135, pour décroître et revenir au point initial au bout de six ou sept jours.

Cette décroissance de la viscosité provient de la consommation de la matière gélatiniforme qui réunit, comme nous l'avons dit, en un vaste réticulum toutes les capsules bactériennes. L'agitation ou le fouettage énergique parvient aussi à désagréger cette zooglée et à enlever au liquide sa viscosité.

Pendant la période de filage, il y a dégagement lent d'anhydride carbonique, qui apparaît sous forme d'îlots blanches à la surface du liquide. Lorsque la viscosité a disparu, la liqueur est couleur café au lait, d'une odeur désagréable de moût gâté. Au fond des ballons, on trouve un dépôt abondant d'une matière amorphe, insoluble dans l'eau, mais soluble presque entièrement dans la potasse très étendue. Cette solution est très visqueuse, et lorsqu'on la neutralise par l'acide acétique, elle se précipite sous forme d'une masse jaunâtre ayant l'aspect de fibrine cuite, mais qui, délayée dans l'eau, se sépare en membranes blanches venant flotter à la surface.

Nous avons dit que, pendant la période du filage, la surface du moût est recouverte d'une matière glaireuse blanchâtre. Celle-ci peut être très facilement séparée du liquide sous-jacent par décantation. Après séparation de cette couche glaireuse, la liqueur restante est beaucoup moins visqueuse. Nous reviendrons bientôt sur la composition de ces trois fractions.

L'intensité du filage occasionné dans le moût par le *B. viscosus bruxellensis* varie-t-elle avec sa composition? Pour répondre à cette question, nous avons fait avec le même malt des moûts de différentes densités, que nous avons ensemencés ensuite avec des cultures pures de cet organisme. Voici les degrés viscométriques constatés après 24 heures :

Moût à 7,8 Balling.....	80
Moût à 10,4 Balling.....	99
Moût à 13,9 Balling.....	120
Moût de lambic à 13 Balling (contenant 40 % de froment) ..	160

On a également ensemencé, dans les mêmes conditions, deux moûts de même densité fabriqués l'un avec du malt séché à l'air, l'autre avec le même malt touraillé. Après 24 heures, ce dernier a accusé un degré viscométrique de 76, le second de 130.

On voit donc que si les moûts de bière sont des milieux très favorables au développement des ferment visqueux, tous ne se comportent pas de la même façon; ils accusent des différences sensibles dans l'intensité de la maladie. Cette observation acquiert une grande importance si, ainsi que nous allons le faire dans le paragraphe suivant, nous parvenons à démontrer que la double face des faros et des lambics est le résultat du filage pré-maturé des moûts de ces bières.

§ V. *Composition chimique des lambics à double face comparée à celle des mêmes lambics sains. Concurrence de la levure et du microbe à double face.* — Les bières à double face présentent-elles une différence dans leur composition chimique essentielle avec les bières saines provenant du même brassin? C'est ce que nous allons rechercher, en mettant en regard les chiffres fournis par l'analyse de quelques lambics. Ceux-ci provenaient de brasseries différentes.

Il y avait dans 100 grammes de liquide :

	LAMBIC M		LAMBIC N		LAMBIC P	
	Bière saine.	Même bière à double face.	Bière saine.	Même bière à double face.	Bière saine.	Même bière à double face.
Extrait.....	3,19	5,85	6,30	6,80	2,90	7,30
Alcool.....	6,4	5,8	6,6	6,0	8,90	5,40
Acides fixes exprimés en acide lactique.....	1,042	4,022	0,940	0,892	0,624	0,704
Acides volatils exprimés en acide acétique.....	0,082	0,120	0,226	0,114	0,348	0,368

La double face du lambic P était excessive.

On voit que les chiffres se rapportant aux teneurs relatives en acides fixes et en acides volatils n'apprennent rien. Un lambic sain peut contenir plus ou moins d'acides fixes, plus ou moins d'acides volatils que le même lambic à double face.

Chez les bières M et N, les acides volatils soumis à la distillation fractionnée, d'après la méthode bien connue de Duclaux<sup>1</sup>, ont fourni comme nombres de la colonne B (rapports des quantités d'acides passées dans les 10, 20, 30, 40... premiers c. c. à la quantité totale d'acide introduite dans le vase à distillation) des chiffres un peu plus élevés pour la bière malade. Chez le lambic P, dont la double face est excessive, il n'y a pas de différence appréciable pour ces deux catégories de chiffres, ainsi qu'on peut en juger.

	LAMBIC P	
	Bière saine.	Bière malade.
1.	6,6	6,6
2.	13,3	13,4
3.	20,0	20,2
4.	27,4	27,1
5.	34,4	34,5
6.	42,2	42,2
7.	50,2	50,4
8.	59,0	59,1
9.	68,7	68,8
10.	80,0	80,0

La comparaison des chiffres qui indiquent les teneurs relatives en alcool et en extrait mérite d'attirer notre attention. On

1. DUCLAUX, Nouveau moyen d'éprouver la pureté des corps volatils. *Annales de chimie et de physique*, 6<sup>e</sup> série, t. VIII, page 542.

voit que les lambies à double face contiennent toujours moins d'alcool et, par suite, plus d'extrait non décomposé que les mêmes bières saines. C'est évidemment que le bacille a génér l'action du saccharomyces.

Dans cette lutte entre la levure et le microbe, celui-ci aura évidemment d'autant plus de chance de succès qu'il sera plus nombreux par rapport à la levure au début, et que les conditions de la fermentation lui seront plus propices.

L'expérience va mieux préciser la portée de cette conception :

Le 8 juin 1897, on a distribué entre dix ballons le même volume du même moût.

Désignons les cultures par les lettres A, B, C, D, E, F, G, H, I, J. Après stérilisation, ces liquides ont été ensemencés, avec les précautions aseptiques d'usage, de la façon suivante :

A.	Avec 5 gouttes d'une dilution d'une levure pure de brasserie.
B.	Avec 5 g. de cette dilut. de lev. et 1 gout. d'une dilut. de mic. de la doubl. face.
C.	—
D.	—
E.	—
F.	—
	La dilution du microbe ajoutée 24 heures après l'ensemencement avec la levure.
G.	Avec 5. g. de cet.lev. et 6 g. d'une dil. de mic. DF aj. 48 h. après l'ens. avec la lev.
H.	—
I.	—
J.	Avec une gout. de la dil. du mic. DF et 24 h. après, avec 5 gout. de la levure.

Les ballons ont fermenté à la température ordinaire. Après la fermentation, les bières ont été soutirées dans des bouteilles que l'on a closes hermétiquement. Le 23 octobre 1897, on les a examinées. Les bières A, B et C étaient restées saines. Toutes les autres étaient filantes et à double face. On a rangé celles-ci dans l'ordre suivant, d'après l'intensité de la double teinte : I, D, H, G, F, J, E. Chez ces dernières, la maladie était la plus accentuée. Au fond de toutes les bouteilles se trouvait un dépôt zoogéiforme abondant.

On remarquera que l'ordre dans lequel les échantillons malades sont rangés correspond à leur degré d'infection microbienne.

D'autres essais du même genre ont été répétés avec des résultats analogues.

On a déterminé dans ces expériences l'extrait et l'alcool d'une

bière à double face, et on a rapproché ces chiffres de ceux accusés par la même bière saine. Voici ces nombres :

	Extrait.	Alcool.	
Bière saine	2,290	2,5	
Bière malade	3,850	4,25	pour 100 grammes de bière.

Nous relevons donc, dans les teneurs en extrait et en alcool, des différences analogues à celles sur lesquelles j'avais appelé l'attention au commencement de ce paragraphe.

Si l'on se rappelle maintenant que les mouts de faro et de lambic ne sont jamais additionnés de levure, et que l'allure de leur fermentation dépend de la nature et du nombre des organismes qui se trouvent logés dans les pores du bois des tonneaux, on ne doit plus s'étonner de la fréquence de l'altération qui fait l'objet de cette étude.

Pendant la première quinzaine qui suit l'entonnement, l'atténuation apparente de ces bières est à peine de 10 0/0 ; au bout de six semaines, de 20 à 40 0/0 ; au bout de trois mois, 61 0/0. On comprend que si les microbes de la double face sont un peu nombreux au début, ils disposeront d'un champ d'action très vaste : alors que les ferment visqueux que l'on trouve généralement en brasserie ne font sentir leur effet que plusieurs semaines, quelquefois plusieurs mois après la fermentation, dans les brasseries bruxelloises à fermentation spontanée ils peuvent utiliser des aliments différents de ceux que l'on rencontre dans la bière après fermentation.

On trouve dans ces conditions spéciales d'existence du microbe, si différentes de celles que l'on rencontre dans les bières ensemencées avec de la levure, le caractère spécial que présente le filage dans certains faros et certains lambics. Nous avons dit, en effet, que dans les bières ensemencées avec de la levure, ce n'est que dans les cas exceptionnels que le filage se présente avec la double face ; le plus souvent, lorsque la viscosité a disparu, la bière est acide, mais encore claire ; chez les lambics et les faros, au contraire, dans lesquels le ferment visqueux aura attaqué les aliments de choix destinés à la levure, la viscosité sera accompagnée de double face, et celle-ci persistera lorsque le liquide aura repris sa fluidité. Mais on comprend également que si le ferment visqueux est peu abondant ou dans un état qui en

rende le rajeunissement pénible, la bière bruxelloise se comporte, à ce point de vue, comme une bière ensemencée avec de la levure et donne lieu à un filage normal sans double face. Enfin, on conçoit que dans les brasseries où les mouts sont additionnés de levure, on puisse avoir des bières visqueuses accompagnées de double face lorsque le microbe aura été assez abondant et assez vigoureux pour disputer aux *saccharomyces* une partie de leurs aliments de choix. Aussi n'est-il pas rare, dans les brasseries où le filage existe à l'état pour ainsi dire permanent, de rencontrer, à côté de brassins entièrement visqueux et sans double face, des bières présentant à la fois la viscosité et la double teinte.

Si nous rapprochons maintenant ces observations de celles du paragraphe précédent, touchant l'influence exercée sur l'intensité du filage par la nature du mout, on se rend aisément compte que le degré de contamination capable de laisser la double face dans certaines bières, sera insuffisant pour produire cet effet dans d'autres. C'est la raison pour laquelle cette affection frappe de préférence les bières fromentacées, par exemple les produits bruxellois à fermentation spontanée et, parmi ceux-ci, le lambic et le faro plutôt que la mars.

§ VI. *Variations de la virulence des B. viscosus bruxellensis.* — Nous avons vu plus haut que le *B. viscosus bruxellensis* se développait souvent, dans les milieux dans lesquels les aliments minéraux et azotés mis à la disposition des fermentations étaient fournis sous forme d'eau de levure, sans qu'il y ait production de filage.

Le microbe n'en conserve pas moins, même après une existence prolongée dans ces liqueurs, la faculté de rendre visqueux le mout de bière ; on peut s'en rendre compte aisément en introduisant après la fermentation un peu des liquides précédents dans du mout. Celui-ci redevient rapidement filant, sans que toutefois le degré de viscosité atteigne celui des mêmes cultures inoculées avec des semences prises à d'autres mouts.

En d'autres termes, l'éducation peut modifier dans des limites très larges la faculté que possède le *bacillus viscosus bruxellensis* de produire le filage dans un milieu approprié. C'est ce que montrent les chiffres suivants, qui se rapportent au degré viscométrique *marimum* atteint par différentes portions d'un mout

ensemencé avec des semences du *bacillus viscosus bruxellensis* prises à différentes sources;

Degré viscométrique du moût .....	18
Inoculé avec semence prise dans un autre moût.....	414
— — — dans culture sur pommes de terre .....	126
— — — dans culture sur albumine .....	140
— — — dans bouillon gélatinisé.....	140
— — — — — recouvert d'huile ..	180
— — — — — moût gélatinisé .....	82
— — — — — eau de levure dextrosée.....	58
— — — — — une bière pasteurisée .....	20
— — — — — une autre bière pasteurisée.....	49

Lorsque le microbe vieillit dans un moût exposé au contact de l'air pur, dans un ballon de Pasteur, il finit par perdre définitivement la propriété de rendre filant un nouveau moût. Il en est de même si pendant la période de développement la culture est continuellement aérée.

En l'absence de l'air dans des moûts liquides et surtout dans les milieux gélatinisés recouverts d'une couche d'huile, le microbe se développe péniblement, mais il conserve toute sa virulence. Les semences les plus actives, à ce point de vue, sont celles qui proviennent de bouillon gélatinisé complètement soustrait au contact de l'air par une couche d'huile.

Ces faits, joints à quelques autres relatés au cours de ce travail, touchent à l'un des points les plus délicats de cette étude.

Tous ceux qui ont eu l'occasion d'étudier le filage ont dû observer des bizarries dans les manifestations de ce que j'appellerai « la fonction visqueuse » des agents de ces fermentations. Ainsi, s'il est très facile de rendre filant du moût au moyen de cultures pures d'un ferment visqueux quelconque, il n'en est pas de même de la bière, qui se comporte à ce point de vue comme de l'eau de levure.

D'un autre côté, il arrive souvent de ne plus pouvoir provoquer de filage au bout d'un certain temps au moyen de semences qui jusque-là avaient manifesté d'une façon régulière leur action si caractéristique.

Certaines eaux de levure non sucrées stérilisées, ensemencées aujourd'hui avec un *bacillus viscosus* quelconque, se laissent envahir par le ferment sans produire de filage, puis un beau jour on les trouve excessivement visqueuses. J'en trouve des exemples nombreux dans mes notes de laboratoire. Ainsi, une eau de

levure parfaitement brillante, ensemencée le 20 juin 1899 par un *B. viscosus* issu d'une culture en moût, se trouble les jours suivants, mais ne manifeste pas les moindres signes de viscosité jusqu'au 22 août 1899, soit après plus de deux mois. Cette eau de levure s'est donc comportée comme de la bière qui deviendrait filante après plusieurs semaines d'embotteillage.

Ce que j'ai dit plus haut des modifications qu'un ferment visqueux peut subir par suite de son éducation rend compte de plusieurs des caprices de ces microbes. Mais, comme nous allons le voir, l'apparition plus ou moins rapide et l'intensité de la fonction visqueuse dépendent aussi de la composition chimique du terrain sur lequel on force à vivre ces organismes.

Nous avons déjà dit qu'une bière, dans la constitution de laquelle entre le froment, devient très facilement filante. Les brasseries bruxelloises à fermentation spontanée en savent quelque chose.

Dans la note que j'ai publiée en 1889 sur les fermentations visqueuses, j'ai établi aussi le rôle important que joue dans l'intensité du filage la teneur du milieu de culture en matières azotées. Les expériences suivantes corroborent cette manière de voir.

Si, à de l'eau de levure dextrosée, on ajoute un peu de peptone ou mieux de l'asparagine, le filage se déclare régulièrement après quelques jours de culture à la température ordinaire. Le filage apparaît plus vite encore et avec plus d'intensité si on neutralise exactement l'acidité de l'eau de levure.

Voici ce qui fait encore mieux toucher du doigt cette action des ferment visqueux sur les matériaux azotés de leur milieu de culture.

Si, à du moût redevenu fluide après avoir passé par une période de filage, on ajoute une solution stérile d'urée ou d'asparagine, le liquide redevient visqueux. La liqueur, traitée par assez peu d'alcool pour empêcher une précipitation de dextrines, donne une masse qui s'agglomère rapidement en une substance gommeuse, par l'agitation avec une baguette de verre. Cette masse peut très facilement être séparée de la liqueur mère par simple décantation. Mise en contact avec de l'eau, elle s'y redissout lentement en la rendant visqueuse. Reprécipitée par l'alcool et redesséchée, elle donne un corps brun, amorphe, d'aspect

vitreux ressemblant à de l'albumine séchée. Soumise à la méthode de dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl, cette substance a fourni dans différentes préparations les chiffres suivants :

AZOTE POUR CENT DE MATIÈRES SÈCHES	
Matière zoogléiforme superficielle (décantée) .....	5,390
— (autre préparation) .....	5,690
Matière zoogléiforme sous-jacente .....	1,649
— (autre préparation) .....	0,7602
Dépôts obtenus après filage (après dissolution dans KOH étendu, filtration pour retenir les cellules et reprécipitation par l'acide acétique) .....	11,61

Ces dépôts sont formés par les cellules microbiennes entourées seulement d'une capsule. On voit d'après ces chiffres que la capsule est de nature azotée, et que la matière zoogléiforme intermédiaire contient, en dehors de la substance qui entoure les cellules, des composés de nature ternaire.

Le microbe de la double face modifie donc à la fois les matériaux azotés et ternaires de son milieu de culture. Nous reviendrons plus loin sur cette dernière action.

§ VII. *Symbiose du B. viscosus bruxellensis avec d'autres organismes.* — Héron<sup>1</sup>, en opérant sur un coccus isolé de bières filantes anglaises, a établi que des cultures pures de ce microorganisme ne sont pas capables de provoquer le filage dans du moût ou de la bière stérilisée. Le microbe s'y développe comme le *B. viscosus bruxellensis* dans l'eau de levure, sans jamais manifester de filage.

Il n'en était pas de même lorsque l'auteur introduisait dans du moût quelques cellules de levure de culture pure en même temps que le ferment filant. Dans ces conditions, le filage se manifestait au bout d'un petit nombre de jours. Héron explique en conséquence l'apparition du filage dans les bières anglaises de la façon suivante : « Lorsque le ferment filant se trouve seul dans le moût, n'étant pas capable d'entamer la molécule de sucre, il ne peut pas exercer son action et produire le filage ; mais quand il y a aussi de la levure en présence, la cellule de levure désagrège la molécule de sucre et par là elle met à la disposition de son associé la matière nutritive dont il a besoin pour se développer ; c'est alors que la bière est atteinte de viscosité. »

1. *Loc. cit.*

Je ferai observer de suite que, d'après Héron lui-même, l'organisme qu'il a étudié se développe dans le moût et dans la bière, mais qu'il n'y produit pas de matière visqueuse. Comme nous l'avons vu pour le *B. viscosus bruxellensis*, celle-ci est produite au moins en partie au détriment des matières azotées du milieu de culture.

L'auteur n'a pas envisagé cette dernière question, et s'il est vrai que le filage des bières anglaises résulte exclusivement d'une modification de leurs hydrates de carbone, les cellules de levure leur feraient donc subir une transformation qui les rendrait plus aptes à être utilisés par ces coccus, pour la production de matière visqueuse.

Revenons maintenant au *B. viscosus bruxellensis*. Nous avons vu que cet organisme rend directement le moût filant et que celui-ci, après avoir passé par une période de viscosité plus ou moins intense suivant sa composition, finit par reprendre sa consistance primitive.

Il n'en est pas de même lorsqu'il est associé avec certains organismes très communs dans les bières, tels que les *mycoderma cerevisiae*.

Du moût ensemencé par le *B. viscosus bruxellensis*, et redevenu fluide, reprend très souvent sa viscosité lorsqu'on introduit dans la liqueur quelques cellules de *mycoderma cerevisiae*. Je dis très souvent, parce que le mycoderme ne se développe pas dans les liqueurs très acides. On sait que 1 0/0 d'acide acétique s'oppose à la croissance de cette plante. Il arrive aussi que beaucoup de lambics ensemencés avec ce champignon ne donnent lieu à aucun développement, tandis qu'il s'y multiplie invariablement lorsqu'on diminue leur acidité en ajoutant du carbonate de soude.

Des cultures redevenues visqueuses sous l'influence du mycoderme le restent pendant très longtemps. Des moisissures communes, tels que le *penicillium glaucum* et l'*aspergillus niger*, se comportent de la même façon, pourvu qu'on les force à rester submergées. Si le développement des mycodermes se fait en surface, leur végétation est assez vigoureuse pour empêcher toute croissance des *B. viscosus*, même lorsque ceux-ci sont ajoutés au moût en très grande quantité et à l'état de cellules jeunes.

Si l'on songe maintenant que le *mycoderma cerevisiae* et les moisissures se multiplient encore d'une façon abondante dans des milieux à peu près exempts d'hydrates de carbone, tels que l'eau de levure, sans ajouter de sucre, on est bien forcé d'admettre, surtout en présence de ce que nous avons dit dans le paragraphe précédent sur l'origine de la matière visqueuse, que dans ces associations le mycoderme ou la moisissure dégrade les substances azotées restées dans le milieu de culture, et les présente aux ferment visqueux sous une forme qu'ils utilisent aisément pour la production de leur capsule gélatineuse.

§ VIII. *Action du B. viscosus bruxellensis sur les hydrates de carbone du milieu de culture.* — En cultivant le *B. viscosus bruxellensis* dans du moût et d'autres liqueurs nutritives contenant de la dextrose, de la saccharose, de la maltose ou de la lactose, on peut s'assurer très facilement que le microbe fait disparaître une portion de la matière ternaire.

D'autre part, l'acidité de la liqueur va en augmentant; lorsqu'on additionne la culture de carbonate de chaux de façon à provoquer la neutralisation des acides au fur et à mesure qu'ils prennent naissance, le ferment peut en une dizaine de jours consommer 75 0/0 de la quantité de dextrose mise à sa disposition dans des solutions d'eau de levure contenant 10 0/0 d'hydrate de carbone. Toutes autres choses égales, la dextrose disparaît d'abord, puis viennent la saccharose, la maltose et la lactose. La saccharose est consommée sans que l'on trouve, à aucun moment de la culture, du sucre interverti dans la liqueur.

Dans les cultures en moût, il y a, comme nous l'avons dit, dégagement d'un peu d'anhydride carbonique; il y a aussi production de traces d'alcool.

L'acidité augmente au fur et à mesure que le degré viscométrique décroît.

Les acides élaborés aux dépens du sucre consistent principalement en acide lactique ordinaire et en acides gras. Ceux-ci, soumis à la distillation fractionnée d'après la méthode de Duclaux, donnent des nombres qui vont en diminuant; quelquefois l'acidité, après avoir diminué au commencement, augmente un peu vers la fin.

Voici les nombres fournis par l'étude de la distillation des acides volatils produits par le microbe de la double face dans différents milieux.

MILIEUX NON ADDITIONNÉS DE CRAIE

	Moût houblonné		Moût non houblonné	
	A	B	A	B
1	1,6	10,5	1,73	42,4
2	4,5	29,5	4,50	20,2
3	1,4	23,1	1,45	33,3
4	1,3	38,4	1,30	46,3
5	1,2	41,3	1,15	50,3
6	1,1	53,6	1,10	57,9
7	1,1	60,9	1,00	64,8
8	1,0	67,5	0,95	71,5
9	1,2	73,4	1,00	78,4
10	1,5	85,4	1,10	86,1
Reste	2,2		Reste	2,0

Ces nombres correspondent à un mélange d'acide butyrique et d'acide acétique.

Les chiffres suivants se rapportent aux acides volatils obtenus dans des milieux additionnés de carbonate de chaux, après ébullition, décomposition de sels de chaux par l'acide oxalique, filtration, distillation jusqu'à obtention de 110 c<sup>3</sup> de distillat.

EAU DE LEVURE DEXTROSÉE (10 %)

	N <sup>o</sup> 1		N <sup>o</sup> 2		EAU DE LEVURE SACCHAROSÉE (10 %)	
	A	B	A	B	A	B
1	3,8	15,5	3,55	19,2	5,55	14,3
2	2,9	27,3	2,80	34,5	4,70	26,4
3	2,5	37,5	2,20	41,	4,05	36,9
4	2,0	45,7	1,80	56,2	3,55	46,1
5	1,7	57,6	1,50	64,4	3,20	54,3
6	1,7	59,5	1,45	70,6	2,90	61,8
7	1,6	66,1	1,00	76,	2,70	68,8
8	1,5	72,2	0,90	80,9	2,60	75,5
9	1,7	79,1	0,75	85,	2,55	82,4
10	2,0	87,3	0,80	89,4	2,80	89,4
Reste	3,1		2,00		4,10	

On voit que ces mélanges sont plus riches en acide butyrique. Dans l'eau de levure dextrosée n<sup>o</sup> 2, les acidités des premières prises sont supérieures à celles de l'acide butyrique normal, par suite de l'existence d'un peu d'acides gras supérieurs.

Si nous rapprochons ces conclusions de ce que nous avons dit, au § V, de la teneur et de la composition des acides volatils des lambics à double face (les chiffres B donnés pour les lambics sont inférieurs à ceux que nous trouvons ici, à

cause des fermentations acétiques dont les bières bruxelloises à fermentation spontanée sont le siège), nous devons conclure que l'action fermentative du *B. viscosus bruxellensis* à l'égard des sucres est indépendante de celle qu'il exerce sur les matières azotées de son milieu de culture.

Le microbe altère dans le moût ces dernières pour donner des filages suivis de double face; mais indépendamment de cela, c'est un ferment des hydrates de carbone, aux dépens desquels il produit de l'acide lactique et des acides gras, soit qu'il attaque les sucres directement, soit que son activité se porte sur les matières gommeuses produites aux dépens des hydrates de carbone. En d'autres termes, entre un lambic qui est resté clair après être devenu visqueux et un lambic à double face, il y a cette seule différence que chez le second l'infection par les *B. viscosus bruxellensis* s'étant produite dès l'origine, les matières azotées de choix contenues dans le milieu de culture ont été modifiées, et cela indépendamment de l'action commune à ces deux variétés de fermentation visqueuse qui s'exerce sur les hydrates de carbone ou sur les composés gommeux qui en résultent.

Si nous songeons maintenant à ce fait que, dans le filage suivi de double face, le rajeunissement des bacilles, dès le début de la culture dans un milieu aussi nutritif que le moût de bière, exalte leur virulence; que l'envahissement des lambics, contenus dans des fûts dans lesquels l'air a pénétré, par les *mycoderma cerevisiae*, est de nature à entretenir le filage en l'aggravant de l'altération des matières azotées restantes, nous aurons synthétisé tous les résultats de ce travail en une formule qui permettra de se rendre compte de la plupart des cas que nous offre la pratique.

# L'ACTION DU SÉRUM SANGUIN SUR LE VACCIN

PAR M. KODJABASCHEFF

Directeur de l'Institut vaccinal de Sofia.

---

Comme supplément au mémoire sur *l'immunité vaccinale* publié par MM. Béclère, Chambon et Ménard dans le numéro de février 1899 de ces Annales, je crois qu'il serait intéressant de rapporter mes observations et mes expériences.

Pendant le deuxième semestre de 1897, j'ai remarqué que le vaccin qui contenait du sang et du sérum sanguin donnait de mauvais résultats. Les génisses que nous avions inoculées à l'Institut avec du vaccin rouge<sup>1</sup> ne donnaient pas toutes des pustules vaccinales. J'ai constaté aussi que le vaccin rouge ne durait pas longtemps; il se décomposait, il se putréfiait.

Au mois de mai 1897, je m'adressai à M. le Directeur de l'Institut Vaccinal Libre Économique de Saint-Pétersbourg, en le priant d'envoyer pour notre Institut 5 grammes de leur vaccin pour améliorer le nôtre. Le 21 mai, je reçus la matière vaccinale qui avait une coloration rouge comme le sirop de framboises: elle contenait une certaine quantité de sang. Le 28 mai, j'en inoculai une génisse selon le procédé classique, en observant toutes les règles de l'asepsie. Au moment de l'inoculation de l'animal, la température était à 38°, et pendant toute la durée de la période vaccinale, son maximum ne dépassa pas 38°.7; les boutons vaccinaux n'étaient pas développés, ils étaient tout à fait secs et nous n'obtinimes point de vaccin. Je fus fortement impressionné par ce fait que le vaccin rouge agissait peu sur l'organisme.

Pendant le mois de juin 1897, j'inoculai quatre génisses avec du vaccin rouge; je remarquai que, pendant toute la durée de la période vaccinale, elles eurent une élévation de température modérée. Leurs boutons vaccinaux présentèrent quelques phéno-

1. Pour abréger la phrase, j'appelle vaccin rouge celui qui contient du sang ou du sérum sanguin.

mènes inflammatoires et, vers le sixième jour, époque de la récolte, ils étaient tout à fait secs.

De la génisse n° 130, je recueillis à part seulement de la lymphe mélangée avec du sang qui coule après l'enlèvement de la pince. Le 13 septembre 1897, avec cette lymphe, j'inoculai quelques boutons à la génisse n° 132, inoculée avec le virus vaccinal de la même génisse 130. Les boutons inoculés avec le virus vaccinal étaient suffisamment développés, tandis que les boutons inoculés avec la lymphe rouge ne l'étaient pas : on n'y observait aucun phénomène inflammatoire, comme s'ils avaient été simplement écorchés. Cette expérience m'amena à penser que la lymphe contenant du sang et du serum sanguin n'agissait pas sur l'organisme.

Non seulement le vaccin rouge donnait de mauvais résultats, avait peu d'activité, mais je constatai aussi qu'après un ou deux mois, même dans la glacière de l'Institut Vaccinal, à la superficie du flacon il se formait une couche microbienne.

Dans le courant de mes observations sur le vaccin rouge, j'étudiai aussi les effets du vaccin incolore ; je constatai que le vaccin qui ne contenait ni sang ni serum sanguin donnait de meilleurs résultats, durait fort longtemps et ne se décomposait pas.

De la matière vaccinale de trois génisses, je pris seulement la croûte et la lymphe se trouvant directement sous la croûte ; je recueillis ce vaccin avec la spatule, sans l'aide de la pince, afin d'éviter de prendre la moindre trace de sang et de serum sanguin. Ainsi formé, ce vaccin était incolore et donna 85 0/0 de succès à la vaccination et à la revaccination.

En continuant mes observations dans la même direction, et comparant les résultats obtenus avec le vaccin rouge et le vaccin incolore, je commençai à soupçonner que la présence du sang et du serum sanguin dans le virus vaccinal de la même génisse était l'une des principales causes qui diminuait l'activité du vaccin.

Mes observations ultérieures me donnèrent l'idée de faire et de répéter l'expérience suivante : d'une même génisse, nous recueillons deux espèces de vaccin : l'un qui contient du sang et du serum sanguin, l'autre qui n'en contient pas. La deuxième espèce de vaccin sans traces de sang et de serum sanguin me donna toujours de meilleurs résultats.

Après ces observations et ces expériences, j'étais convaincu que le sérum sanguin avait une action opposée à celle du vaccin lorsqu'ils étaient mélangés : je l'écartai alors complètement ; nous faisons donc la récolte de la matière vaccinale rien qu'avec la spatule sans pince, en prenant la croûte, la lymphe sise sous la croûte, et, pour éviter la moindre trace de sang, nous passons une seule fois la spatule. Le vaccin ainsi formé est incolore, dure longtemps, de 6 à 9 mois, ne se décompose pas et possède une grande activité.

Les observations suivantes sont très intéressantes au point de vue de l'activité et de la durée du vaccin exempt de sérum sanguin :

*a)* N° 19, recueilli le 28 mars 1898, inoculé le 25 juin, plus de deux mois et demi après la récolte : succès, 95 0/0 à la vaccination et à la revaccination ;

*b)* N° 22, recueilli le 29 mars 1898, inoculé le 30 juin, trois mois après la récolte : succès 93 0/0 ;

*c)* N°s 24 et 25, recueillis le 30 mars 1898, inoculés le 15 octobre, 6 mois après la récolte : succès 85 0/0 ;

*d)* De ces mêmes n°s 24 et 25, le 31 août, 10 flacons furent envoyés à un vaccinateur en province, qui les inocula du 9 au 18 décembre avec 85 0/0 de succès, à la vaccination et à la revaccination, c'est-à-dire que ces n°s 24 et 25, après avoir séjourné trois mois et demi hors de la glacière de l'Institut vaccinal, et neuf mois après la récolte, donnèrent encore une réussite de 85 0/0.

Je dois rappeler que les mêmes vaccins furent conservés dans l'Institut et furent inoculés pendant les chaleurs de l'été dont on connaît l'influence sur les décompositions.

Le nouveau procédé de récolte de la matière vaccinale exempte de sérum sanguin fut introduit par moi au commencement de l'année passée 1898, et, dans mon rapport n° 592 du 23 juin 1898, j'en donnais connaissance à M. le Président du Conseil sanitaire supérieur; dans ce rapport, j'expliquais les raisons qui m'avaient guidé pour l'introduction du nouveau procédé.

Jusqu'à la fin de 1897, nous faisions la récolte du vaccin selon le procédé suivant : avec la pince, nous enserrions le bouton vaccinal, nous prenions la croûte de la pustule vaccinale, la lymphe sise sous la croûte et la lymphe qui coulait après

l'enlèvement de la pince : ce mélange formait la matière vaccinale qui, d'habitude, avait une coloration rosée.

La statistique nous montre que le résultat des vaccinations et des revaccinations pour les années 1895, 1896, 1897 fut de 69 0/0, 71 0/0, 74 0/0 de succès; tandis que, pour l'année passée 1898, nous avions un chiffre de 83;16 0/0. Pour l'année courante jusqu'à la fin du mois d'octobre, nous avons un chiffre de 80,55 0/0, bien que, pendant le premier semestre, on ait eu à vacciner les conscrits; or, pour la majeure partie des soldats, c'est une revaccination qu'on fait.

Pendant l'année 1895, on a inoculé à l'Institut 83 génisses, dont 56 réussies et 27 non réussies. En 1896, on a inoculé 303 génisses, dont 228 réussies et 75 non réussies. En 1897, on inocula 139 génisses, dont 121 réussies et 18 non réussies. En 1898, on inocula 40 génisses et toutes réussies; pendant l'année courante jusqu'au premier de ce mois-ci, on avait inoculé 14 génisses toutes réussies.

Comme je viens de le dire, jusqu'à la fin de 1897, nous mélangions la lymphe rouge avec la matière vaccinale : je crois donc que c'était la lymphe rouge qui diminuait l'activité du virus vaccinal et qu'elle était la cause, pour les années 1895, 1896, 1897, du nombre considérable de 120 génisses non réussies, tandis que celles qui avaient réussi avaient leurs boutons vaccinaux peu développés relativement à ceux des génisses vaccinées pendant 1898 et 1899, et je crois que la matière vaccinale exempte de sérum sanguin doit avoir réellement une activité beaucoup plus grande.

---

# APPAREILS A RÉCOLTER LE SÉRUM SANGUIN

PAR M. A. LATAPIE

Aide au laboratoire de M. E. Metchnikoff.

---

Les méthodes généralement employées pour recueillir le sang qui doit servir à la préparation du sérum présentent, grâce à la complexité des manœuvres qu'elles exigent, des chances assez nombreuses de contamination ; de plus, le caillot, une fois formé, ne livre pas tout le sérum qu'il contient ; une bonne quantité reste emprisonnée dans les mailles de la fibrine et se perd.

C'est dans le but d'atténuer ce double inconvénient que nous avons construit les deux appareils que nous décrivons ici. Les chances de contamination s'y trouvent, en effet, singulièrement diminuées, puisqu'il ne peut y avoir de contact entre le liquide et l'air extérieur depuis le moment où l'on ponctionne le vaisseau de l'animal jusqu'à celui où le sérum est recueilli dans son récipient définitif.

De plus, en divisant le caillot au moyen d'une série de tubes de verre plongeant dans la masse sanguine, nous l'obligeons à livrer une quantité de sérum infinitélement plus considérable que celle obtenue par les procédés habituels.

Nous présentons ici deux appareils fondés tous deux sur le même principe : l'un destiné à recueillir le sang chez les petits animaux de laboratoire : lapin, cobaye, rat, pigeon, etc. ; l'autre servant à saigner les animaux de grande taille : cheval, âne, bœuf, chèvre, etc. En voici la description sommaire :

## 1<sup>o</sup> APPAREIL POUR RECUEILLIR LE SANG CHEZ LES PETITS ANIMAUX.

Il se compose essentiellement de deux parties : un tube trocart (A) (fig. 1) destiné à ponctionner le vaisseau ; un réservoir-pipette (B) destiné à recueillir le sérum.

Le tube trocart (A) est un tube à expérience ordinaire ouvert à une extrémité ; à l'autre, il se termine par une courte effilure coudée, très aiguë et fermée à la lampe.

Le réservoir pipette (B), d'un diamètre un peu supérieur à

celui de (A), est un tube en verre, étranglé légèrement en son milieu, ouvert à sa partie supérieure, fermé par le fond et portant à ce niveau une longue éffilure (E) coudée deux fois, qui sert à l'écoulement du sérum. Sur le milieu de la hauteur une tubulure (T), bouchée avec de la ouate, permet l'accès de l'air dans l'appareil.

Le fond porte de plus une ampoule (M). L'extrémité ouverte du tube trocart s'embouche dans l'ouverture du réservoir pipette ; les deux sont reliées l'une à l'autre par une bague de caoutchouc (C). A l'intérieur de l'appareil est placé librement un tube en verre (V) fermé à un bout, ouvert à l'autre, percé de trous.

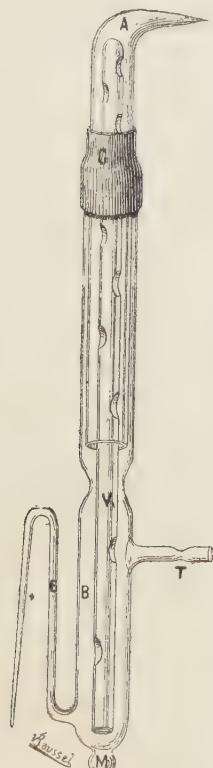


Fig. 1.

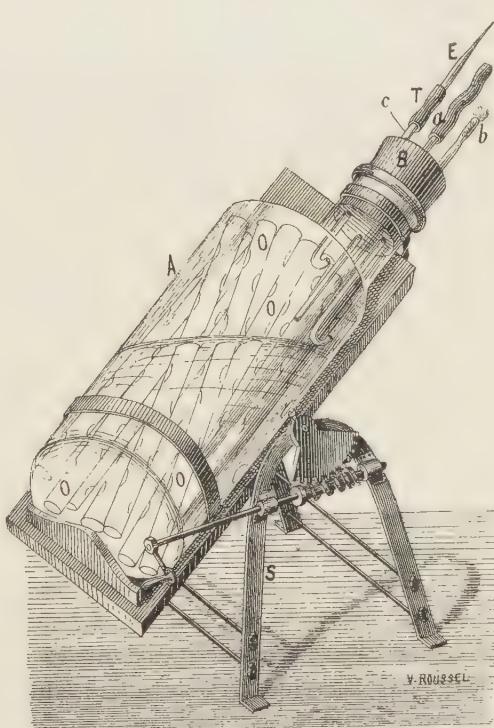


Fig. 2.

Ce tube servira de noyau autour duquel viendra se rétracter le caillot. On peut fixer ces appareils sur des supports avec pinces pour faciliter la manipulation.

*Mode d'emploi.* — Supposons qu'il s'agisse de saigner un cobaye. L'appareil, dans lequel on a laissé quelques gouttes d'eau, a été préalablement stérilisé à l'autoclave à 120°. L'animal, couché sur le dos, est fixé sur l'appareil contenteur; son cou est rasé, lavé, désinfecté au sublimé. On fait à la peau une longue incision médiane et l'on découvre une carotide; l'artère est isolée sur la sonde cannelée; une première ligature est placée sur le bout supérieur et serrée fortement; une seconde est placée sur le bout inférieur, mais non serrée: on ne la serrera que l'opération terminée, pour arrêter l'hémorragie. Sur le bout inférieur, on place encore une pince à force-pression, distante de la ligature supérieure de deux centimètres environ. On flambe et l'on casse en sifflet avec une pince stérile l'effilure du tube (A), on enfonce la pointe dans l'artère, dirigée vers le cœur, en maintenant le vaisseau de la main gauche par le fil ligature; un aide enlève la pince et le sang monte doucement dans l'appareil. On arrête la saignée avant que le tube (A) ne soit complètement rempli; on ferme l'effilure à la lampe, en aspirant légèrement en (T) pour empêcher le sang de couler pendant que l'on ferme; on laisse ensuite reposer l'appareil, le tube trocart en bas.

Le caillot se forme autour de la tige (V), se rétracte autour d'elle, abandonnant ainsi les parois du tube (A); si cette rétraction était incomplète, il serait aisément de la compléter en aspirant un peu par la tubulure (T): le caillot achève, de la sorte, de se détacher. Dès que la coagulation est faite, il n'y a qu'à retourner l'appareil, le sérum tombe dans le réservoir pipette, limpide et abondant. Au bout de quelques heures le caillot, achevant de se rétracter, abandonne dans le réservoir les dernières traces du sérum qu'il détient.

Les globules du sang, s'il s'en trouve entraînés avec le sérum, se déposent au fond de l'ampoule (M). Il ne reste plus alors, pour recueillir le sérum dans un vase stérile, qu'à briser, après l'avoir flambée, la pointe de l'effilure (E), et à chasser par cette voie le liquide, en soufflant dans la tubulure (T). On recueille ainsi une quantité maxima de sérum, 80 0/0 de la masse totale, dans des conditions d'asepsie parfaite.

Cet appareil, en usage depuis un an dans les laboratoires de l'Institut Pasteur, a donné de très bons résultats.

On peut, avec des tubes en rapport avec la grosseur de l'ani-

mal, et un peu d'habileté, saigner plusieurs fois des animaux de très petite taille, tels que rat, oiseau, etc., sans les tuer.

**2<sup>o</sup> APPAREIL POUR RECUEILLIR LE SANG DES ANIMAUX DE GRANDE TAILLE.**

Il se compose essentiellement de :

1<sup>o</sup> Un grand flacon (A, fig. 2) de plusieurs litres, destiné à recueillir le sang ; son large goulot, latéral, est bouché au moyen d'un bouchon de caoutchouc (B) percé de trois trous qui doivent livrer passage à divers tubes en verre ;

2<sup>o</sup> Un certain nombre de cylindres en verre (O) ouverts aux deux bouts, percés d'orifices sur toute leur longueur. Le tout est placé à l'intérieur du flacon. Ces tubes sont destinés à diviser et à maintenir le caillot adhérent autour de chacun d'eux ;

3<sup>o</sup> Trois tubes en verre qui traversent le bouchon et viennent s'ouvrir à l'intérieur du flacon.

L'un (*a*) sert à l'entrée du sang, son extrémité libre est reliée par un tube de caoutchouc au trocart qui ira ponctionner la veine.

Le tube (*b*) sert simplement à l'entrée de l'air dans le flacon et au maintien de la pression atmosphérique à l'intérieur de ce dernier. L'extrémité inférieure est fortement recourbée vers le bouchon.

Le tube (*c*) sert à l'écoulement du sérum. L'extrémité inférieure se recourbe vers le bouchon ; l'extrémité libre se continue par un tube de caoutchouc (T), qui porte lui-même à l'autre bout un tube de verre (E) effilé et fermé à la lampe. On peut appliquer sur le segment de caoutchouc une pince à forcipres-  
sure, qui interrompt de la sorte la communication entre les deux segments de verre.

*Mode d'emploi.* — L'appareil est préalablement stérilisé à l'autoclave, et le bouchon luté ensuite à la paraffine. On enfonce le trocart dans une veine de l'animal à saigner ; le sang s'écoule dans le flacon ; on laisse celui-ci s'emplir jusqu'à la moitié de sa hauteur, il ne faut pas que le niveau du liquide atteigne l'extrémité du tube à air. On laisse reposer l'appareil 12 heures environ, pour laisser au caillot le temps de se former ; puis on le fait doucement basculer en lui donnant une position inclinée, le goulot étant dirigé vers le bas ; un support (S) fixe le flacon.

dans cette situation. Le caillot s'est rétracté autour des cylindres (O) auxquels il adhère, et le sérum tombe au fond.

Les globules rouges entraînés ne peuvent pénétrer dans les tubes (b) et (c) à cause de leur extrémité recourbée.

Pour recueillir le sérum, on pose une pince sur le segment de caoutchouc (T); on flambe et on brise l'effilure (E), que l'on enfonce dans le récipient où l'on conservera le sérum. Cela fait, on enlève la pince et le sérum s'écoule.

Dans cette opération, une faible couche de sérum restera sur le fond du bouchon; cette couche contiendra les globules rouges entraînés. Il faut donc: 1<sup>o</sup> que l'ouverture du tube d'écoulement soit assez voisine du fond pour que la quantité de sérum perdu soit minime; 2<sup>o</sup> qu'elle en soit suffisamment éloignée pour que les globules du sang n'y puissent pénétrer.

Veut-on arrêter l'écoulement du sérum, on replace la pince sur le segment de caoutchouc et l'on ferme l'effilure à la lampe.

Grâce à l'extrême division du caillot dans cet appareil, la quantité de sérum fourni représente, d'après nos expériences, près du double du volume de sérum recueilli avec les procédés usuels; c'est ainsi qu'un litre de sang donne au moins 700 centimètres cubes de sérum, au lieu de 400 à 450 centimètres cubes, chiffre habituel.

Pour recueillir dans les abattoirs le sang de bœuf que l'on ne peut saigner aseptiquement par ponction de la jugulaire (opération qui se fait d'ordinaire en recueillant le sang dans des cloches stériles), on peut, dans notre appareil, remplacer le tube porte-trocart (a) par un entonnoir stérile dans lequel on reçoit le sang. L'opération terminée, on remplace l'entonnoir par un bouchon de caoutchouc stérile.

*Nota.* — Pour la stérilisation des appareils, il sera bon de les envelopper de papier à filtre, puis de chauffer lentement afin d'éviter la casse, et de mouiller le coton pendant l'opération.

# QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA RAGE

PAR LE DR PAMPOUKIS,  
Directeur de l'Institut hellénique d'Athènes.

## I

Les cas de morsure par des personnes enragées sont rares. Sur 1,300 mordus traités à notre Institut, de 1894, date de la fondation, à la fin de 1898 :

1.208 soit 92.8 0/0 avaient été mordus par des chiens;

58 — 4,4 — — — chats;

16 — 1,2 — — — divers animaux;

et 48 — 4,3 avaient été contaminés par de la salive.

Il s'est produit cependant un cas de morsure chez une personne non traitée à l'Institut. Le 29 août 1898, un enfant de 10 ans fut mordu par un chien. La rage a paru 31 jours après. Le lendemain cet enfant a mordu son père au bras droit, et est mort le surlendemain. Le père est venu se soumettre au traitement et est encore en bonne santé.

## II

Nous avons observé en 1899 deux cas de rage imaginaire.

A. — Le 2 janvier, nous avons soumis au traitement un étudiant en droit, mordu par un chien enragé.

Le 6 janvier, à savoir 13 jours après la morsure, le malade a été pris de mélancolie ; il pleurait sans cause ; le lendemain il a commencé à se mordre et à mordre sa mère qui voulait l'en empêcher ; un jour après, ayant cru qu'il était pris de paralysie au pied droit, il tomba par terre et ne voulait pas se relever ; de plus, il ne voulait pas boire ; mais les jours suivants, tous ces symptômes se sont peu à peu effacés. Le traitement n'y était sûrement pour rien. Le malade était névropathe.

B. — M. S..., de 24 ans, mordu par un chien le 28 février, a été soumis au traitement le 5 mars ; deux jours après, il a senti de la difficulté à avaler ; il avait de l'hydrophobie ; il avait aussi de la tendance à mordre, mais il n'a mordu personne, ayant été

enfermé dans sa chambre ; le lendemain il se sentait mal à la tête, des fourmillements aux membres ; dans deux jours, guérison.

Nous avons vu de suite que nos deux malades n'avaient que la rage imaginaire ; en effet, l'incubation n'avait duré que 13 jours chez l'un et 7 jours chez l'autre : celle de la vraie rage est plus longue ; d'ailleurs, nous n'avons observé ni fièvre ni d'autres symptômes.

Ces deux cas sont remarquables non seulement pour la rage imaginaire, mais aussi parce que l'un des malades, dans un accès, a mordu sa mère, et que l'autre avait montré de la tendance à mordre.

### III

Notre savant maître M. Roux et M. Nocard ont fait voir en 1890 que le virus rabique se trouve dans la salive des chiens 2-3 jours au moins avant que la maladie soit déclarée.

Voici, sur ce sujet, une observation assez importante : le 5 juin 1898, un chien à Volos a mordu une femme. Il a continué à se montrer bien portant pendant *huit* jours ; à ce moment, la maladie s'est déclarée, et il a mordu deux enfants qui nous ont été amenés et ont subi le traitement ; mais la femme qui avait été mordue la première, croyant qu'elle était en sûreté parce que la morsure avait eu lieu 8 jours avant l'apparition de la maladie chez le chien, n'est pas venue subir le traitement ; 69 jours après la morsure, elle a été prise de rage et est morte deux jours après.

D'après ce cas, le virus rabique peut exister dans la salive du chien 8 jours avant l'apparition de la maladie, ou du moins de ses symptômes furieux.

### IV

Sur 43 enragés (non traités) morts en Grèce de 1894 à 1898 la maladie s'est déclarée :

Le premier mois après la morsure chez 4, soit en proportion de 9,3 : 0/0.

Le deuxième — — 23 — — 53,4 : 0/0.

Le troisième — — 16 — — 37,2 : 0/0.

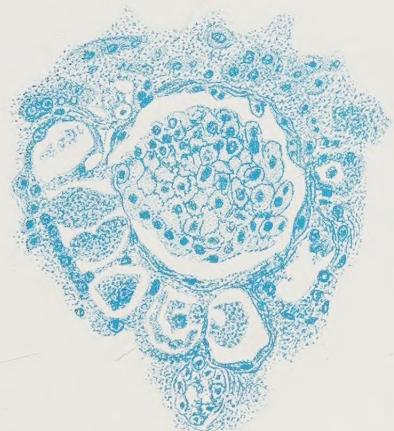
Les deux tiers environ des cas de rage se sont déclarés pendant les deux premiers mois après la morsure.

---

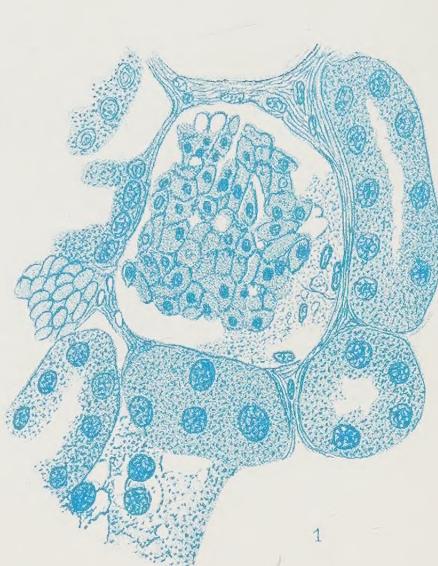
*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.



3



1



4

2

